



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
CAMPUS FLORESTA CENTRO MULTIDISCIPLINAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

SILVANA DANIEL DA SILVA

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA, DEMOGRAFIA E CICLO DE VIDA
DE *Daphnia magna*, SUBMETIDA AO ÓLEO DE ANDIROBA, USADO
COMO REPELENTE NO CONTROLE DA DENGUE

SILVANA DANIEL DA SILVA

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA, DEMOGRAFIA E CICLO DE VIDA DE *Daphnia magna*, SUBMETIDA AO ÓLEO DE ANDIROBA, USADO COMO REPELENTE NO CONTROLE DA DENGUE

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal do Acre – *Campus Floresta*.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Erlei Cassiano Keppeler

CRUZEIRO DO SUL

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

S586a Silva, Silvana Daniel da, 1981 -

Avaliação ecotoxicológica, demográfica e ciclo de vida de *Daphnia magna*, submetida ao óleo de andiroba, usado como repelente no controle da dengue / Silvana Daniel da Silva; orientadora: Profa. Dra. Erlei Cassiano Keppeler. – 2024.

41 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. Cruzeiro do Sul, 2024.

Inclui referências bibliográficas e anexo.

1. Óleo de andiroba. 2. Toxicologia ambiental. 3. Dengue – Prevenção e controle. I. Keppeler, Erlei Cassiano, (orientadora). II. Título.

CDD: 363.7

Bibliotecária: Alanna Santos Figueiredo – CRB 11º/1003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA, DEMOGRAFIA E CICLO DE VIDA DE *Daphnia magna*, SUBMETIDA AO ÓLEO DE ANDIROBA, USADO COMO REPELENTE NO CONTROLE DA DENGUE

SILVANA DANIEL DA SILVA

Dissertação aprovada em 19 de abril de 2024, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal do Acre – Campus Floresta, pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:



Documento assinado digitalmente

ERLEI CASSIANO KEPPELER

Data: 01/05/2024 22:59:31-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Erlei Cassiano Keppeler – UFAC – Orientadora e Presidente

Documento assinado digitalmente



CARLA FERNANDES MACEDO

Data: 02/05/2024 10:54:51-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Carla Fernandes Macedo – UFRB/BA – Titular 1

Documento assinado digitalmente



ANDREA MARTINI

Data: 02/05/2024 13:03:13-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Andréa Martini - UFAC/CZS - Titular 2

Documento assinado digitalmente



MARIA SUSANA BARBOZA DA SILVA

Data: 05/05/2024 00:21:37-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Maria Susana Barboza da Silva - UFAC/CZS - Titular 3

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, que minha base e a minha família que me todo suporte e força pra continuar. Á Universidade Federal do Acre, representada pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação pelo financiamento do Cartão Pesquisador que deu suporte à pesquisa e pela bolsa de Pós-Graduação, concedida pela CAPES.

RESUMO

O estudo da toxicidade, tanto aguda quanto crônica de *Daphnia magna*, é crucial para compreender os efeitos de substâncias como o óleo de andiroba, antes de sua utilização em larga escala como repelente de mosquitos. Além disso, é essencial reconhecer o papel dos testes de toxicidade em invertebrados aquáticos na determinação dos impactos químicos no meio ambiente, integrando assim a ecologia com a toxicologia na ecotoxicologia. Nesse contexto, a pesquisa focou na avaliação da toxicidade aguda do óleo de andiroba em *Daphnia magna*, examinando tanto a imobilidade quanto a mortalidade desses organismos e apresentando os resultados de maneira estatisticamente robusta. *Daphnia magna* é um organismo modelo amplamente utilizado em testes toxicológicos devido à sua distribuição em ambientes aquáticos, ciclo de vida curto e facilidade de criação em laboratório. No cultivo dos cladóceros e realização dos experimentos, foi utilizada água natural e algas *Chlorella sorokiniana* como alimento. A cultura de *Daphnia* foi mantida em meio EPA modificado. As condições experimentais envolveram frascos transparentes de 50 mL, com proporção 1:1 de água do meio e substância teste. Cada frasco recebeu 10 neonatos (<24h) de *D. magna*. Foram realizadas análises demográficas para determinar a duração média de vida, expectativa de vida, taxa bruta e líquida de reprodução, tempo de geração e taxa intrínseca de crescimento populacional. A utilização de técnicas como análise probit e análise estatística ANOVA ou Kruskal Wallis, seguida pelo teste de Tukey, permitiu uma compreensão mais aprofundada de como o óleo de andiroba afeta a *Daphnia* em diferentes concentrações e períodos de exposição. Os resultados mostraram que o óleo de andiroba tem efeitos tóxicos em *Daphnia magna*, evidenciando a necessidade de avaliar cuidadosamente a segurança desse produto químico e seus riscos. O estudo ressaltou a importância de considerar as concentrações e o tempo de exposição ao analisar efeitos ecotoxicológicos, crucial para a liberação do uso do óleo de andiroba. Esses achados são essenciais para entender como essas substâncias afetam organismos aquáticos, além de sua relevância para a saúde humana e o meio ambiente, e os possíveis impactos do óleo de andiroba como repelente.

Palavras-chave: Toxicidade; Cladocera; andiroba; riscos

ABSTRACT

The study of toxicity, both acute and chronic, of *Daphnia magna* is crucial to understanding the effects of substances such as andiroba oil, before their large-scale use as a mosquito repellent. Furthermore, it is essential to recognize the role of toxicity testing on aquatic invertebrates in determining impacts on the environment, thus integrating ecology with toxicology in ecotoxicology. In this 7epelent, the research focused on evaluating the acute toxicity of andiroba oil on *Daphnia magna*, examining both the immobility and mortality of these organisms and presenting the results in a statistically robust manner. *Daphnia magna* is a model widely used in toxicological tests due to its distribution in aquatic environments, short life cycle 7epelent of rearing in the laboratory. When cultivating the cladocerans and carrying out the experiments, natural water and Chlorella sorokiniana algae were used as food. *Daphnia* culture was maintained in modified EPA 7epele. The experimental conditions involved 50 mL 7epelente77e bottles, with a 1:1 ratio of 7epele water and test substance. Each bottle received 10 neonates (<24h) of *D. magna*. Demographic analyzes were carried out to determine average life span, life expectancy, gross and net reproduction rate, 7epelente7 time and intrinsic population growth rate. The use of techniques such as probit analysis and ANOVA or Kruskal Wallis statistical analysis, followed by the Tukey test, allowed a more in-depth understanding of how andiroba oil affects *Daphnia* in 7epelente concentrations and periods of exposure. The results showed that andiroba oil has toxic effects on *Daphnia magna*, highlighting the need to carefully evaluate the safety of this 7epelent product and its risks. The study highlighted the importance of considering concentrations and exposure time 7epe analyzing ecotoxicological effects, crucial for allowing the use of andiroba oil. These findings are essential to understand how these substances affect aquatic organisms, in addition to their relevance to human health and the environment, and the possible impacts of andiroba oil as a repellent.

Key words: Toxicity; Cladocera; andiroba oil; risks.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1 Regressão linear das concentrações para determinar as porcentagens da mortalidade para *Daphnia magna* após 24 h (a), 48 h (b), 72h (c) e 96h (d). de exposição ao óleo de andiroba.....20-21
- FIGURA 2.1 Sobrevivência (lx) de *Daphnia magna* cultivada em meio EPA (a) e óleo de andiroba à 0,1 e 0,2 (b e c)..... 31-32
- FIGURA 2.2 Fertilidade (mx) de *Daphnia magna* cultivada em meio EPA (a) e óleo de andiroba à 0,1 e 0,2 (b e c). 32-33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores de CE_{50} , em diferentes tempos de exposição, para diversos micro-organismos aquáticos expostos a compostos oleaginosos e/ou de origem constantes na literatura.....	23
TABELA 2.1 ANOVA para 24, 48, 72 e 96 horas, em diferentes concentrações do óleo de andiroba.....	25
TABELA 2.2 Resultados do Teste de Tukey para 24, 48, 72 e 96 horas, em diferentes concentrações do óleo de andiroba.....	26-27
TABELA 3.1 – Resultados da ANOVA ou Kruskall Wallis.....	32
TABELA 3.2 – Resultados do teste de Tukey ou Dunn.....	33-34

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL	11
BIBLIOGRAFIA.....	17
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE <i>Daphnia magna</i>, SUBMETIDA AO ÓLEO DE ANDIROBA, USADO COMO REPELENTE NATURAL	20
RESUMO	20
ABSTRACT	20
INTRODUÇÃO	21
METODOLOGIA	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
AGRADECIMENTOS.....	30
BIBLIOGRAFIA.....	30
RESUMO	32
ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
CONCLUSÃO	42
AGRADECIMENTOS.....	42
BIBLIOGRAFIA.....	42
ANEXO	44

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL

O *Aedes aegypti* é o mosquito transmissor das doenças dengue, Zika e Chikungunya. No Brasil, o Ministério da Saúde relatou, em entrevista, um aumento no número de casos registrados, chegando a aproximadamente 229 mil; um crescimento de 264% nos primeiros meses de 2019, conseqüentemente, aumentando a quantidade de mortes. Conforme essa entrevista, o Distrito Federal e os estados do Acre, Tocantins, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Goiás e Mato Grosso do Sul foram os territórios que registraram aumento do número de casos da doença. Também houve um aumento no número de casos de Zika registrados no período, sendo assinalados 2.062 casos da doença. Em 2018, no mesmo período, foram registrados 1.908 casos prováveis. Em 2019, não foram registradas mortes por Zika. Já a Chikungunya registrou uma queda de 44% no número de casos. Em 2019, foram registrados 12.942 casos no país, com uma incidência de 6,2 casos/100mil hab. Em 2018, foram 23.484 casos. Também não foram registradas mortes pela doença em 2019.

O óleo de andiroba¹ é uma substância natural extraída das sementes da árvore andiroba. A andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) além de sua relevância na produção do óleo, é reconhecida por suas propriedades repelentes de insetos incluindo o mosquito *Aedes aegypti*, transmissor das doenças dengue, Zika e Chikungunya. Descrita pela primeira vez pelo botânico francês Jean-Baptiste Christopher Fuscé Aublet (1720-1778), em 1775, na Guiana Francesa, como pertencente à família das meliáceas, a andiroba é uma árvore de grande porte que pode atingir 30m de altura.

Seu óleo, comumente utilizado na Amazônia, não só tem sido historicamente empregado como fonte de iluminação alternativa em períodos de escassez de querosene, como também possui propriedades repelentes de insetos, incluindo o mosquito *Aedes aegypti*, transmissor de doenças como dengue, Zika e Chikungunya. Durante a I Guerra Mundial, quando faltou querosene, no interior da Amazônia, o uso desse óleo para a iluminação foi comum, como fartamente registrado no período de 1854 a 1864 pelos moradores da cidade de Belém, sendo substituído pelo gás somente em 1896, quando a luz elétrica foi finalmente adotada (FRANCO, 1998).

¹ A andiroba é uma denominação indígena do tupi-guarani que significa sabor amargo (nhandi - óleo e rob - amargo) associado aos limonoides presentes nos galhos, troncos e sementes (PESCE, 1941; GUIMARÃES et al., 1970).

O fruto da andiroba é um ouriço redondo composto por quatro valvas, cada uma medindo entre 3 e 4mm de espessura, são coriáceas, duras e de cor parda. Quando amadurece, o fruto se abre, deixando cair no chão suas sementes, que variam em número de 7 a 9 e se assemelham à castanha portuguesa. Essas sementes são poligonais, com uma superfície plana na parte interna e convexa na parte externa. Elas possuem uma casca lisa, um tanto esponjosa e de cor marrom, que envolve uma massa branca, levemente rosada, compacta, porém não muito dura e oleosa. A semente é composta aproximadamente por 25% de casca e 75% de uma massa oleaginosa, contendo cerca de 43% de óleo (PESCE, 1941; GUIMARÃES et al., 1970).

A extração do óleo das sementes de andiroba pode ser feita por prensagem mecânica ou de forma tradicional. O método tradicional, comumente adotado por comunidades ribeirinhas, envolve várias etapas, desde a coleta e seleção das sementes até a extração do óleo (MENDONÇA; FERRAZ, 2007).

O Brasil destaca-se mundialmente por sua vasta biodiversidade, representando aproximadamente 20% de toda a vida no planeta, o que o torna um terreno fértil para estudos que exploram produtos naturais (CALIXTO, 2003). Nesse contexto, o óleo de andiroba tem sido reconhecido pelo seu potencial como repelente para combater a dengue. Conforme reportado por Nery (2014), a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (Apae) desenvolveu um repelente à base de óleo de andiroba para esse fim, em uma técnica que remonta às práticas indígenas, onde as sementes são quebradas para extrair o óleo. Na medicina popular, o óleo é amplamente utilizado para tratar tosse, dor de garganta, contusões musculares e ferimentos na pele (PENIDO et al., 2006; NAYAK et al., 2011; BURLAND; CORNARA, 2017).

A Fundação Oswaldo Cruz desenvolveu e colocou no mercado a vela de andiroba para combater os mosquitos transmissores da dengue e da malária. O produto foi aprimorado com a adição de glicerina, álcool de cereais e essência de eucalipto ou citronela. No entanto, ainda não se tem conhecimento sobre seu uso pelas comunidades, nem sobre testes padronizados para avaliar sua toxicidade. (FERRAZ et al., 2002).

Entretanto, alguns estudos indicam que o óleo de andiroba, proveniente da espécie *Carapa* sp. (Meliaceae), possui propriedades repelentes de insetos e apresenta potencial anti-inflamatório (RIBEIRO et al., 1999). Pinto (1963) relata que comunidades tradicionais e

povos indígenas têm utilizado o óleo de andiroba como repelente de insetos, incluindo o mosquito *Aedes aegypti*, transmissor da dengue

Outrossim, o uso medicinal do óleo de andiroba está alinhado com a Política Nacional de Saúde e é considerado uma prioridade de pesquisa. As espécies *Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D.C. (Meliaceae) são comumente conhecidas na região amazônica como andirobeira (FISH, et al., 1995). Nas áreas da Amazônia brasileira, as árvores de andirobeira são utilizadas em sistemas agroflorestais (CONDÉ et al., 2013), no enriquecimento de áreas desmatadas e na recuperação de ecossistemas úmidos (FERRAZ et al., 2002). Sua madeira tem alto valor comercial, sendo empregada na construção de moradias, fabricação de móveis e na construção naval (SHANLEY; LONDRES, 2011).

O clima desempenha um papel crucial nas questões ambientais, influenciando tanto a paisagem física quanto as sociedades humanas. As temperaturas mais altas e os climas quentes comuns na Amazônia aumentam a capacidade de infecção dos mosquitos, contribuindo para a adaptação dos vetores de doenças. No entanto, a segurança do uso do óleo de andiroba como repelente de mosquitos tem sido questionada devido à sua toxicidade aguda e crônica em organismos aquáticos, como a *Daphnia magna*.

Segundo Barcellos et al. (2009), um dos efeitos do clima é alterar a ecologia dos vetores, como os mosquitos. Nos trópicos, acredita-se que as doenças transmissíveis e parasitárias encontraram melhores condições para sua expansão, constituindo um elevado risco devido à vulnerabilidade da maioria da população (MENDONÇA, 2005). A temperatura global pode continuar afetando o desenvolvimento de insetos vetores.

A qualidade da água, por sua vez, também pode favorecer a proliferação de doenças como a dengue. O cloro, por exemplo, tem se tornado um aliado no combate à dengue em fontes de água, e a limpeza tem sido utilizada para evitar que as fêmeas do mosquito aproveitem a água parada para depositar os ovos e iniciar o ciclo de vida do mosquito (O Estadão em São Paulo, 2015). Nesse sentido, o experimento com água desclorada mostrou-se mais favorável ao desenvolvimento embrionário do *Aedes aegypti*, proporcionando o menor tempo de desenvolvimento e maior viabilidade. Além do aspecto do cloro, outras variáveis de qualidade da água devem ser investigadas para observar a relação com a dengue. A alta concentração de nitrogênio amoniacal atrai o *Aedes aegypti* para a oviposição.

A volatilização dessa substância, provavelmente, foi o atrativo químico responsável pela orientação do voo das fêmeas grávidas em direção aos recipientes onde colocaram seus ovos (Diário da Saúde, 2010), permitindo que o inseto que transmite a doença procrie até oito vezes mais larvas do que em águas não contaminadas.

Daphnia spp. são microcrustáceos pertencentes à ordem Cladocera, reconhecidamente representativos das espécies de zooplâncton, e largamente utilizados em testes ecotoxicológicos para a verificação da qualidade da água (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Este gênero de pequenos crustáceos planctônicos varia de 0,2 a 6,0mm de comprimento. *Daphnia* spp. Fazem parte da ordem Anomopoda e são denominadas popularmente denominados como pulgas de água, devido ao seu estilo de natação saltatória, semelhante aos movimentos das pulgas. Vivem em diversos ambientes aquáticos, desde pântanos ácidos a lagos e lagoas de água doce.

Microcrustáceo de água doce, a *Daphnia magna* tem sido amplamente utilizada como indicador biológico em estudos e controle de qualidade da água e em testes de toxicidade na avaliação de efluentes (NIETO, 2000). Testes de toxicidade podem ser definidos como procedimentos nos quais as respostas de organismos-teste são utilizadas. O uso do bioindicador *Daphnia*, para avaliação da toxicidade é usualmente o primeiro teste a ser aplicado, com duração de 48 horas, devido à sua sensibilidade a uma ampla variedade de poluentes., sendo a espécie altamente sensível a uma grande diversidade de poluentes.

A partir dessas observações e através dos testes de toxicidade e análises químicas, vários pesquisadores intensificaram os estudos para identificar as possíveis interações dos agentes tóxicos presentes em efluentes e seus consequentes efeitos sobre a biota aquática. No entanto, até hoje, uma grande parcela dessas interações e a previsão de seus efeitos, ainda são difíceis de serem determinadas ou estimadas apenas por análises químicas de efluentes industriais complexos, principalmente aqueles que possuem substâncias orgânicas sintéticas de elevada toxicidade (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

As espécies do gênero *Daphnia* são comumente usadas como organismos-teste para verificar a toxicidade aguda e crônica (HANAZATO, 1998; KUNGOLOS et al., 1999) devido à sua alta sensibilidade a muitos produtos químicos tóxicos. A *Daphnia magna* é amplamente utilizada como um organismo indicador ecotoxicológico padrão, e existem protocolos para seu uso na análise da toxicidade de substâncias em condições experimentais

agudas e crônicas. Nesse contexto, a avaliação da toxicidade do óleo de andiroba em organismos aquáticos pode ajudar a determinar se o produto é seguro para uso em ambientes aquáticos e se pode ser utilizado em programas de controle de vetores.

Essas características tornam a *Daphnia magna* um organismo modelo conveniente para avaliar a toxicidade aguda e crônica de compostos químicos em testes de curto prazo. No entanto, é importante lembrar que os resultados obtidos em experimentos com esse organismo não podem ser diretamente extrapolados para outras espécies. Portanto, é necessário realizar experimentos adicionais em organismos mais complexos para confirmar os resultados obtidos em experimentos de curto prazo. A necessidade de estudar a toxicidade aguda e crônica do óleo de andiroba sobre a *Daphnia magna* é importante por várias razões.

Em primeiro lugar, esta é um organismo aquático amplamente utilizado em testes de toxicidade, uma vez que é altamente sensível a várias substâncias tóxicas presentes no ambiente aquático. Como resultado, os estudos de toxicidade que utilizam *Daphnia magna* podem fornecer informações importantes sobre a toxicidade de produtos químicos para organismos aquáticos e, por extensão, para ecossistemas aquáticos inteiros.

Em segundo lugar, o óleo de andiroba é frequentemente utilizado na medicina tradicional e em produtos de cuidados pessoais, bem como em inseticidas e pesticidas. No entanto, é possível que ele contenha substâncias tóxicas que possam ser prejudiciais aos organismos aquáticos, incluindo a *Daphnia magna*. Portanto, estudar a toxicidade aguda e crônica do óleo de andiroba sobre a *Daphnia magna* ajudaria a avaliar os riscos potenciais que o óleo pode representar para organismos aquáticos e para o meio ambiente como um todo. Esses estudos também auxiliariam a desenvolver diretrizes para o uso seguro do óleo de andiroba em produtos ecológicos e de cuidados pessoais.

Daphnia spp. são microcrustáceos pertencentes à ordem Cladocera, reconhecidamente representativos das espécies de zooplâncton e largamente utilizados em testes ecotoxicológicos para a verificação da qualidade da água (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Espécies do gênero *Daphnia*, com grande participação na comunidade zooplancônica em todo o mundo, têm tido sua biologia bastante estudada (HERBERT, 1978). Assim, *Daphnia magna* é um pequeno crustáceo frequentemente usado como modelo de estudo em ecotoxicologia, especialmente para avaliar o impacto de substâncias químicas em organismos aquáticos. A espécie é particularmente útil como modelo de estudo porque é facilmente

cultivada em laboratório, tem um curto ciclo de vida e é sensível a uma ampla gama de poluentes ambientais.

Outrossim, o estudo acerca de *Daphnia magna* merece destaque na pesquisa sobre a toxicidade na água, uma vez que são organismos aquáticos cujo habitat natural é semelhante às condições naturais encontradas na água. Além disso, o breve tempo de exposição e os pequenos volumes de amostras utilizadas são aspectos importantes na utilização deste microcrustáceo (ABNT, 2016). A *Daphnia* é amplamente utilizada como um organismo indicador ecotoxicológico padrão, e existem protocolos para seu uso na avaliação da toxicidade de substâncias sob condições experimentais agudas e crônicas (BAIRD, 1989). Trata-se de um gênero de pequenos crustáceos planctônicos, com comprimento variando de 0,2 a 6,0mm (0,01–0,24pol), pertencentes à ordem Anomopoda e são um dos vários pequenos crustáceos aquáticos comumente denominados de pulgas de água, devido ao seu estilo de natação saltatória semelhante ao das pulgas. A *Daphnia* spp. vivem em vários ambientes aquáticos que variam de pântanos ácidos a lagos e lagoas de água doce.

Além do mais, a toxicidade aguda e crônica têm sido amplamente investigadas, como referido por Wollenberger (2000). O microcrustáceo *Daphnia magna* é sensível a substâncias tóxicas e de fácil cultivo em laboratório, sendo, portanto, um modelo útil nessa área (BOWNIK, 2017). Assim, segundo Straus (1820) a *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) atua na cadeia alimentar aquática como consumidor primário entre os metazoários. Suas pernas torácicas são compostas por cerdas que agem como peneiras, retendo algas, bactérias e pequenas partículas de material orgânico da água. O alimento é transferido para a boca, onde é moído pelas mandíbulas e direcionado para o trato digestivo (KNIE; LOPES, 2004).

Em laboratórios, a alimentação da *Daphnia magna* consiste em algas verdes como *Desmodesmus subspicatus*, *Chlorella* ssp, *Pseudokirchneriella subcapitata* (RATTE et al., 2003). A *Daphnia* já é uma espécie modelo estabelecida em toxicologia do crustáceo de água doce, sendo usada para monitoramento ambiental de poluentes em todo o mundo (SHAW, 2008). Os Daphnideos representam 8% de todos os dados experimentais para animais aquáticos nos bancos de dados toxicológicos (DENSLOW et al., 2007, apud SHAW, 2008).

Em conclusão, *Daphnia magna* pode ser utilizada como um modelo de estudo para avaliar a toxicidade do óleo de andiroba em organismos aquáticos. Estudos indicam que o

óleo pode ter efeitos prejudiciais na espécie em concentrações elevadas, sugerindo que deve ser utilizado com cuidado em ambientes aquáticos.

BIBLIOGRAFIA

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda: Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera)**. 4. ed. Rio de Janeiro, 2016.
- BAIRD, D. J. The use of *Daphnia* in ecotoxicology. In: CALOW, P. (Ed.). **Handbook of Ecotoxicology**. Oxford: Blackwell Science, 1989. p. 188-209.
- BOWNIK, A. *Daphnia magna* as a model organism in toxicology. **Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, v. 35, n. 1, p. 77-96, 2017.
- BURLAND, T. M.; CORNARA, L. Copaiba oleoresin: Composition and biological activity. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 7, p. 1153-1156, 2017.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, São Paulo, 2003.
- CONDÉ, A. R. et al. Sistema agroflorestal com andirobeira (*Carapa guianensis* Aubl.) na Amazônia brasileira. **Revista Árvore**, v. 37, n. 6, p. 1091-1099, 2013.
- FERRAZ, J. et al. Restoration of seasonally flooded forest in the Amazon, Brazil: Vegetation establishment following enrichment planting. **Restoration Ecology**, v. 10, n. 4, p. 483-490, 2002.
- FISH, L. et al. **Tree Flora of Sabah and Sarawak**, Volume 5. Kota Kinabalu: Forest Research Institute Malaysia, 1995.
- FRANCO, A. B. **A Casa-Grande & o Sobrado**: Arquitetura e vida doméstica nas famílias de poder da Amazônia (1870-1940). Manaus: Editora da Universidade Federal do Amazonas, 1998.
- GUIMARÃES, R. D. A. et al. Produtos da flora brasileira com uso na agricultura: andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). **Informe Agropecuário**, v. 7, n. 82, p. 59-61, 1970.
- HANAZATO, T. The role of *Daphnia* in freshwater ecosystem: A review. **Hydrobiologia**, v. 363, n. 1-3, p. 159-167, 1998.
- KNIE, E.; LOPES, S. **Fisiologia digestiva em animais**. São Paulo: Editora ABC, 2004.

KUNGOLOS, A.; SAMARAS, P.; KIPOPOULOU, A.M.; ZOUMBOULIS, A. & SAKELLAROPOULOS, G. P. **Interactive toxic effects of agrochemicals on aquatic organisms.** Wat. Sci. Tech. 40: 357-364, 1999.

MENDONÇA, F. Clima, Tropicalidade e saúde: uma perspectiva a partir da intensificação do aquecimento global. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 1, n. 1, p. 100-112, 2005.

MENDONÇA, R. M. N.; FERRAZ, I. D. K. Métodos de extração do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 1, p. 99-106, 2007.

NAYAK, B. S. et al. Evaluation of wound-healing activity of oil from *Anacardium occidentale*. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 6, p. 922-926, 2011.

NERY, F. O. **O óleo de andiroba como repelente para a dengue.** Revista Brasileira de Saúde Pública, v. 12, n. 3, p. 45-60, 2014.

NERY, V. (2014). **Apae cria repelente à base de óleo de andiroba para combater a dengue - notícias em Acre.** Disponível em: [https://g1.globo.com/ac/acre/noticia/2014/10/apae-cria-repelente-base-de-oleo-de-andiroba-para-combater-dengue.html#:~:text=Nesta%20quinta%20feira%20\(23\),natural%20desde%20julho%20deste%20ano](https://g1.globo.com/ac/acre/noticia/2014/10/apae-cria-repelente-base-de-oleo-de-andiroba-para-combater-dengue.html#:~:text=Nesta%20quinta%20feira%20(23),natural%20desde%20julho%20deste%20ano) . Acesso em: 28 jun. 2022.

NIETO, D. *Daphnia magna* as a model organism in aquatic toxicology. **Water Research**, v. 34, n. 1, p. 225-232, 2000.

PENIDO, A. B. et al. Investigação etnobotânica, química e farmacológica de óleos essenciais das espécies do gênero *Copaifera* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 475-486, 2006.

PESCE, C. Oleaginosas da Amazônia. Belém, **Revista da Veterinária**, 1941. 128p.

PINTO, L. S. Óleo de andiroba: seu uso como repelente de insetos. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 14, n. 2, p. 289-294, 1963.

RATTE, H. T. et al. **Guidelines for algal and cyanobacterial biomonitors of freshwater and terrestrial environments.** Jena: VCH, 2003.

RIBEIRO, A. et al. Estudo preliminar sobre a atividade anti-inflamatória do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9, n. 1, p. 40-42, 1999.

SHANLEY, P.; LONDRES, M. Brazilian copaiba oil: sustainability and market potential of an ancient Amazonian remedy. **Forest Ecology and Management**, v. 261, n. 9, p. 1557-1565, 2011.

SHAW, J. L. Daphnia as an emerging model for toxicological genomics. In: TIERNEY, K. B. (Ed.). **The Toxicology of Fishes**. CRC Press, 2008. p. 163-184.

SISINNO, Cristina Lucia Silveira; OLIVEIRA-FILHO, Eduardo Cyrino. **Princípios de toxicologia ambiental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

WOLLENBERGER, L. Acute and chronic toxicity of organic chemicals to cladocerans. In: CALOW, P. (Ed.). **Handbook of Ecotoxicology**. Oxford: Blackwell Science, 2000. p. 166-181.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETT, M. M. Análises químicas de efluentes industriais complexos e estimativa de seus efeitos sobre organismos aquáticos. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1085-1092, 2006.

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE *Daphnia magna*, SUBMETIDA AO ÓLEO DE ANDIROBA, USADO COMO REPELENTE NATURAL

ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF *Daphnia magna*, SUBMITTED TO ANDIROBA OIL, USED AS A NATURAL REPELLENT

RESUMO

A diferença entre toxicidade aguda e crônica é fundamental, destacando a importância da avaliação dos efeitos do óleo de andiroba em organismos aquáticos, como a *Daphnia magna*, antes de seu uso como repelente de mosquitos em larga escala. Além disso, é mencionada a relevância dos testes de toxicidade em invertebrados aquáticos para a determinação dos impactos químicos no meio ambiente, bem como a integração da ecologia com a toxicologia na ecotoxicologia. A pesquisa avaliou a toxicidade aguda do óleo de andiroba em *Daphnia magna*, analisando a imobilidade e mortalidade das Daphnias e apresentando os resultados como média \pm desvio padrão. A técnica estatística de análise probit foi usada para calcular os valores de CE50, enquanto a análise estatística foi realizada com ANOVA ou Kruskal Wallis, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. Os resultados mostram como o óleo de andiroba afetou as Daphnias em diferentes concentrações e tempos de exposição, destacando a importância da compreensão dos impactos ambientais. Esses insights são importantes para a avaliação de riscos no ambiente aquático.

Palavra-chave: toxicidade. Ecotoxicologia. Daphnias.

ABSTRACT

The difference between acute and chronic toxicity, highlighting the importance of evaluating the effects of andiroba oil on aquatic organisms, such as *Daphnia magna*, before its use as a large-scale mosquito repellent. It also mentions the relevance of toxicity tests on aquatic invertebrates for determining chemical impacts on the environment, as well as the integration of ecology with toxicology in ecotoxicology. The research evaluated the acute toxicity of andiroba oil on *Daphnia magna*, analyzing the immobility and mortality of Daphnias, presenting the results as mean \pm standard deviation. The statistical technique of probit analysis was used to calculate EC50 values, while statistical analysis was performed with

ANOVA or Kruskal Wallis, followed by Tukey's post-hoc test. The results show how andiroba oil affected *Daphnias* at different concentrations and exposure times, highlighting the importance of understanding environmental impacts. These insights are valuable for risk assessment in the aquatic environment.

Key words: toxicity. Ecotoxicology. *Daphnias*.

INTRODUÇÃO

A toxicidade aguda refere-se aos efeitos tóxicos imediatos de uma substância em um organismo exposto a uma dose única ou em curto prazo. Já a toxicidade crônica refere-se aos efeitos tóxicos cumulativos ou em longo prazo em um organismo exposto a uma substância por um período prolongado. Assim, é importante avaliar a toxicidade aguda e crônica do óleo de andiroba em organismos aquáticos, como a *Daphnia magna*, antes de considerar seu uso como repelente de mosquitos em larga escala para o controle.

Nesse sentido, a realização de testes de toxicidade com invertebrados aquáticos fornece importante suporte na determinação de impactos químicos ao meio ambiente (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990). A caracterização ecotoxicológica de efluentes líquidos industriais é uma ferramenta para ações de controle da poluição das águas. Com um quadro de contaminação ambiental evidente e agravando-se a cada dia, existe preocupação com o aumento dos casos de poluição no ambiente, bem como com os reflexos desse fato para sua qualidade. Para identificar o nível de poluição no ambiente, utilizam-se os conceitos de toxicologia, que consistem no estudo dos efeitos deletérios causados por determinadas substâncias em organismos vivos (BAIRD; CANN, 2011).

Além disso, esses testes de toxicidade podem ser definidos como procedimentos nos quais as respostas dos organismos testados são utilizadas para detectar ou avaliar os efeitos adversos ou não de uma ou mais substâncias sobre os sistemas biológicos (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990). Dentre os objetivos de aplicação do teste de toxicidade, um dos principais consiste em obter dados científicos que possam ser aplicados para a avaliação do risco de substâncias químicas ao ecossistema e à dinâmica populacional (DÖRR et al., 2014). Green e Wheeler (2013), em experiências ao longo de vários anos com diferentes organismos (algas, crustáceos e peixes), relatam que a utilização de solventes na concentração recomendada no protocolo padronizado não causa efeitos sobre os organismos teste.

Nesse contexto, a toxicologia tem sido definida como o corpo da ciência dedicado a investigar os efeitos nocivos produzidos a partir de compostos químicos nos organismos vivos (COSTA, 2018). Nos testes toxicológicos, é fundamental determinar qual organismo-teste melhor se adapta para identificar como seus efeitos são manifestados. A necessidade de quantificar os efeitos da poluição nos organismos vivos gerou a integração da ecologia com a toxicologia (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013), e, de acordo com Dörr et al. (2014), essa interação ficou denominada ecotoxicologia. Ela abrange a caracterização, a compreensão e o prognóstico dos efeitos deletérios de substâncias, visando manter e aumentar a produção com menor uso de recursos naturais e fertilizantes sintéticos (DÖRR et al., 2014).

Assim, os testes de toxicidade agudas demandam mais tempo e trabalho; no entanto, quando comparados com os testes de toxicidade crônica de uma geração, permitem obter melhores resultados sobre o risco potencial real do objeto de estudo (MASELLI et al., 2017). Existem diversos testes de toxicidade já bem estabelecidos, sendo que alguns são padronizados em âmbito nacional e internacional por associações ou organizações de normalização, como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Portanto, os objetivos deste trabalho foram: a) determinar a toxicidade aguda e crônica do óleo de andiroba em *Daphnia magna*, utilizando diferentes concentrações do produto químico e avaliando a sobrevivência do organismo aquático após uma exposição (CE50) em 24, 48 e 96 horas. b) Contribuir para os estudos de toxicidade aguda e crônica, avaliando os efeitos do óleo de andiroba em curto prazo em *Daphnia magna*. Nesse sentido, a análise de diferentes concentrações do produto químico é importante para entender como a toxicidade varia com a quantidade de exposição. c) Comparar os resultados do estudo com os valores limites de toxicidade estabelecidos por agências reguladoras para avaliar se o uso do óleo de andiroba como repelente para controle da dengue é seguro para organismos aquáticos.

METODOLOGIA

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análises de Água e Limnologia da Universidade Federal do Acre, localizado no *Campus* de Cruzeiro do Sul. Para avaliar a

toxicidade aguda do óleo de andiroba em *Daphnia magna*, neonatos com idades entre 2 e 26 horas foram expostos a amostras qualitativas ou a diferentes diluições quantitativas da substância por um período de 24 e 48 horas. Para o cultivo dos organismos-teste foi utilizado o meio EPA, que é composto por NaHCO_3 , NaCl , MgSO_4 e KCl , dissolvidos em água destilada.

Além disso, as culturas de *Daphnia magna* foram mantidas em temperatura controlada de 25°C , e a densidade de alga foi mantida em 1×10^6 células/mL. Para o cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana* foi utilizado o meio Bold's Basal Medium (BBM) recomendado pelo Centro de Cultura de Algas e Protozoários de Cambridge (CCAP). Os neonatos de *Daphnia magna* foram obtidos a partir de fêmeas ovígeras, mantidas em culturas selecionadas, e foram expostos a diferentes concentrações da substância testada em frascos de vidro com meio EPA e *C. sorokiniana* como fonte de alimento. Assim segundo Knie e Lopes (2004), os espécimes usados no ensaio foram inseridos com menos de 24h para uso em bioensaios. Conforme Ratte et al. (2003), a diferença de sensibilidade está relacionada com a idade e com o tempo de exposição.

Desse modo, foram utilizadas três repetições para o controle e cinco concentrações (0,1, 0,2, 0,4, 0,8 e 1,6 % (ou mL.L^{-1}) de óleo de andiroba, onde em cada concentração, foram realizados testes em 24, 48, 72 e 96 horas, utilizando cinco neonatos em cada repetição (ABNT, 2016). A contagem de organismos sobreviventes foi realizada diariamente. Os valores de CE50, que representam a concentração efetiva mediana que causa efeito agudo em 50% dos organismos no tempo de exposição, foram calculados utilizando a análise Probit. Além disso, a regressão linear e o coeficiente de correlação de Pearson também foram determinados usando o programa Past. As condições experimentais foram mantidas em uma sala climatizada a 20°C , no escuro.

A água utilizada para a diluição pode ser recuperada ou natural. O ambiente natural foi demonstrado por um teste de viabilidade, com água natural, no qual não houve exposição a no mínimo 15 organismos de teste distribuídos em três réplicas (ABNT, 2016), e a percentagem fixada de mortalidade fosse inferior ou igual a 10% de exposição por 48 horas, no controle. O método incluiu a exposição de recém-nascidos do gênero *Daphnia* em uma amostra (qualitativa) ou diluições múltiplas de uma amostra (quantitativa), durante o um período do teste.

Foram realizadas análise dos dados de imobilidade e/ou mortalidade de *Daphnias*; e os resultados, apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os valores de CE50 também foram calculados usando análise probit que é uma técnica estatística usada para determinar a concentração de uma substância que causa um efeito específico em 50% dos organismos expostos. Além do mais, a análise estatística foi realizada por meio de análise de variância unidirecional (ANOVA) ou teste de Kruskal-Wallis, dependendo da normalidade e homogeneidade de variância (avaliadas pelo teste Shapiro Wilk), seguida pelo teste post-hoc de Tukey para avaliar a significância estatística das diferenças entre as respostas aos tratamentos. A significância estatística foi estabelecida ao nível de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o *software* Graphpad.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicam que o óleo de andiroba teve um efeito tóxico nas *Daphnias* em ambos os tempos de exposição (24h e 48h). Os coeficientes de determinação e correlação de Pearson mostraram uma forte correlação positiva entre as concentrações e a mortalidade em 24h e uma correlação moderada em 48h. Isso significa que quanto maior a concentração de óleo de andiroba, maior é a mortalidade dos Dafnideos.

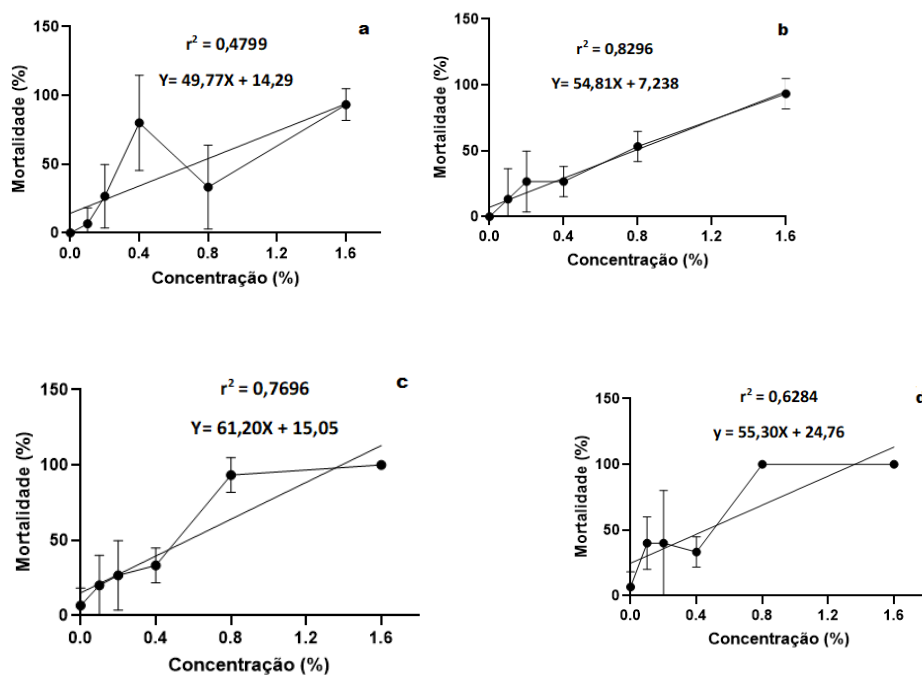
Os valores de CE₅₀ para os testes de toxicidade aguda foram de 0,6370 para 24h., 0,7290 para 48h., 0,4511 para 72h. e de 0,3493 mL.L⁻¹, para 96h. No estudo de Miura et al. (2021), foi avaliado a toxicidade aguda do organismo modelo *Daphnia magna* de sete óleos essenciais de interesse em aquicultura, sendo eles: *Lippia alba*, *Lippia gracilis*, *Mentha piperita*, *Ocimum gratissimum* and *Piper callosum*, que apresentaram variação na CE_{50-48h}, 3,59 mg.L⁻¹ para 43,74mg.L, sendo mais tóxicos que o óleo de andiroba. Por outro lado, para o biopesticida Neem, a Concentração efetiva mediana (CE_{50-48h}.) para *D. magna* foi 0,17mL.L⁻¹, valor inferior ao observado neste estudo. Similarmente, as CE₅₀ de *Daphnia magna* e outros micro-organismos, em diferentes tempos de exposição descritos na TABELA 1, foram também inferiores aos valores encontrados em nosso estudo. Por outro lado, foi encontrado também alguns valores maiores (1,43% e 5.20%), para *Daphnia magna* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente.

TABELA 1. Valores de CE₅₀, em diferentes tempos de exposição, para diversos micro-organismos aquáticos expostos a compostos oleaginosos e/ou de origem constantes na literatura

Organismo-teste	Substância - Tempo de exposição	CE ₅₀ ou IC ₅₀	Referência
<i>Daphnia magna</i>	Águas residuais oriundas da produção de azeite - 24 h.	1,2 mg.L ⁻¹ (0,0012mL.L ⁻¹)	Paixão et al. (1999)
<i>Aedes stephensi</i> (larva)	Óleos essenciais - 24 h.	61,65 µg.mL ⁻¹ (0,00006165mL.L ⁻¹)	Govindarajan et al. (2016)
<i>Aedes aegypti</i> (larva)	Óleos essenciais - 24 h.	67,13 µg.mL ⁻¹ (0,00006713mL.L ⁻¹)	Govindarajan et al. (2016)
<i>Culex quinquefasciatus</i> (larva)	Óleos essenciais - 24 h.	72,45 µg.mL ⁻¹ (0,00007245mL.L ⁻¹)	Govindarajan et al. (2016)
<i>Culex tritaeniorhynchus</i> (larva)	Óleos essenciais - 24 h.	78,87 µg.mL ⁻¹ (0,00007887mL.L ⁻¹)	Govindarajan et al. (2016)
<i>Vibrio fisheri</i>	Águas residuais do óleo extraído da azeitona (30min)	0,24 % (0,24 mL.L ⁻¹)	Babic et al. (2019)
<i>Daphnia magna</i>	Águas residuais do óleo extraído da azeitona (48h;)	1,43% (1,43 mL.L ⁻¹)	Babic et al. (2019)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Águas residuais do óleo extraído da azeitona (96h.)	5,20% (5,20 mL.L ⁻¹)	Babic et al. (2019)

Nesse estudo, concluiu-se que a concentração de óleo de andiroba necessária para causar efeito tóxico em 50% dos dafnideos, mostrando que houve um aumento significativo na mortalidade das *Daphnias* a partir da concentração de 5% de óleo de andiroba, e que houve uma diminuição significativa na mortalidade em resposta ao aumento das concentrações de adição. Isso sugere que a substância tem um efeito tóxico em uma concentração relativamente baixa, mas que, em concentrações mais elevadas, pode haver uma redução no efeito tóxico.

FIGURA 1.1 Regressão linear das concentrações para determinar as porcentagens da mortalidade para *Daphnia magna* após 24 h (a), 48 h (b), 72h (c) e 96h (d). de exposição ao óleo de andiroba.



Fonte: Os autores

Os resultados da análise de variância revelaram resultado significativo para todas as concentrações (TABELA 2.1), em 24h., 48h., 72h. e 96h. ($p < 0,05$), e a comparação entre os pares de médias, realizada através do Teste de Tukey é apresentada na TABELA 2.2.

TABELA 2.1 ANOVA para 24, 48, 72 e 96 horas, em diferentes concentrações do óleo de andiroba.

	F	P
24-h	9,055	0,0009
48-h	13,47	0,0001
72-h	21,36	<0,0001
96-h	11,58	0,0003

Fonte: Os autores

TABELA 2.2 Resultados do Teste de Tukey para 24, 48, 72 e 96 horas, em diferentes concentrações do óleo de andiroba

24 horas					
	Diferença de média	Significante?	Sumário	Valor de P ajustado	
Teste de comparação múltipla de Tukey					
0 vs. 0,2	-26,67	Não	Ns	0,6837	A-C
0,1 vs. 0,2	-20	Não	Ns	0,8691	B-C
0 vs. 0,4	-80	Sim	**	0,0082	A-D
0,1 vs. 0,4	-73,33	Sim	*	0,0153	B-D
0,2 vs. 0,4	-53,33	Não	Ns	0,0975	C-D
0 vs. 0,8	-33,33	Não	Ns	0,4748	A-E
0,1 vs. 0,8	-26,67	Não	Ns	0,6837	B-E
0,2 vs. 0,8	-6,667	Não	Ns	0,9989	C-E
0,4 vs. 0,8	46,67	Não	Ns	0,1746	E-D
0 vs. 1,6	-93,33	Sim	**	0,0025	A-F
0,1 vs. 1,6	-86,67	Sim	**	0,0045	B-F
0,4 vs. 1,6	-13,33	Não	Ns	0,9728	F-D
0,2 vs. 1,6	-66,67	Sim	*	0,0285	F-C
0,8 vs. 1,6	-60	Não	Ns	0,0531	E-F
48 horas					
	Diferença de média	Significante?	Sumário	Valor de P ajustado	
Teste de comparação múltipla de Tukey					
0 vs. 0,1	-13,33	Não	Ns	0,8937	A-B
0 vs. 0,2	-26,67	Não	Ns	0,3533	A-C
0,1 vs. 0,2	-13,33	Não	Ns	0,8937	B-C
0 vs. 0,4	-33,33	Não	Ns	0,1677	A-D
0,1 vs. 0,4	-20	Não	Ns	0,6326	B-D
0,2 vs. 0,4	-6,667	Não	Ns	0,9941	C-D
0 vs. 0,8	-53,33	Sim	*	0,0126	A-E
0,1 vs. 0,8	-40	Não	Ns	0,0728	B-E
0,2 vs. 0,8	-26,67	Não	Ns	0,3533	C-E
0,4 vs. 0,8	-20	Não	Ns	0,6326	D-E
0 vs. 1,6	-93,33	Sim	***	0,0001	A-F
0,1 vs. 1,6	-80	Sim	***	0,0005	B-F
0,2 vs. 1,6	-66,67	Sim	**	0,0023	C-F
0,4 vs. 1,6	-60	Sim	**	0,0053	D-F

Fonte: Os autores

72 horas

	Diferença de média	Significante?	Sumário	Adjusted Valor de P ajustado	
Teste de comparação múltipla de Tukey					
0 vs. 0,2	20	Não	Ns	0,5886	A-C
0 vs. 0,4	26,67	Não	Ns	0,3086	A-D
0 vs. 0,8	86,67	Sim	***	0,0001	A-E
0 vs. 1,6	93,33	Sim	****	<0,0001	A-F
0,1 vs. 0,2	6,667	Não	Ns	0,9927	B-C
0,1 vs. 0,4	13,33	Não	Ns	0,8741	B-D
0,1 vs. 0,8	73,33	Sim	***	0,0007	B-E
0,1 vs. 1,6	80	Sim	***	0,0003	B-F
0,2 vs. 0,4	6,667	Não	Ns	0,9927	C-D
0,2 vs. 0,8	66,67	Sim	**	0,0015	C-E
0,2 vs. 1,6	73,33	Sim	***	0,0007	C-F
0,4 vs. 0,8	60	Sim	**	0,0036	D-E
0,4 vs. 1,6	66,67	Sim	**	0,0015	D-F
0,8 vs. 1,6	6,667	Não	Ns	0,9927	E-F

96 horas

	Diferença de média	Significante?	Sumário	Valor de P ajustado	
Teste de comparação múltipla de Tukey					
0 vs. 0,2	33,33	Não	Ns	0,348	A-C
0 vs. 0,4	26,67	Não	Ns	0,5674	A-D
0 vs. 0,8	93,33	Sim	***	0,0008	A-E
0 vs. 1,6	93,33	Sim	***	0,0008	A-F
0,1 vs. 0,2	0	Não	Ns	>0,9999	B-C
0,1 vs. 0,4	-6,667	Não	Ns	0,9979	B-D
0,1 vs. 0,8	60	Sim	*	0,0246	B-E
0,1 vs. 1,6	60	Sim	*	0,0246	B-F
0,2 vs. 0,4	-6,667	Não	Ns	0,9979	C-D
0,2 vs. 0,8	60	Sim	*	0,0246	C-E
0,2 vs. 1,6	60	Sim	*	0,0246	C-F
0,4 vs. 0,8	66,67	Sim	*	0,0121	D-E
0,4 vs. 1,6	66,67	Sim	*	0,0121	D-F
0,8 vs. 1,6	0	Não	Ns	>0,9999	E-F

Os valores de CE50 (a concentração que causa efeito em 50% dos organismos) foram de 6,878% para 24 horas e 2,778% para 48 horas de exposição ao óleo de andiroba. Isso significa que a concentração necessária para causar efeito em 50% dos organismos testados é relativamente baixa. A partir dessas concentrações, a substância causou um efeito tóxico significativo nos organismos testados. O estudo de Wong et al. (2009) também observou efeitos tóxicos semelhantes em outras substâncias similares ao óleo de andiroba em *Daphnia*.

Logo, os resultados sugerem que o óleo de andiroba tem efeitos subletais e letais nos organismos de *Daphnia*, o que pode afetar as cadeias alimentares aquáticas e a biodiversidade desses ecossistemas. Por isso, é importante considerar o impacto dessas substâncias quando utilizadas no combate à contaminação por dengue e malária, especialmente em ambientes aquáticos sensíveis.

Concluiu-se, portanto, que o óleo de andiroba tem potencial tóxico para organismos aquáticos como *Daphnia magna*, e que concentrações mais elevadas da substância são mais prejudiciais. Isso pode indicar que a substância óleo de andiroba também apresenta um efeito tóxico em *D. magna* e pode ser útil para avaliar a toxicidade de outros produtos químicos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Acre, representada pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, pelo financiamento do Cartão Pesquisador que deu suporte à pesquisa, e pela bolsa de Pós-Graduação concedida pela CAPES.

BIBLIOGRAFIA

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda: Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera)**. 4. ed. Rio de Janeiro, 2016.

BABIC S. et al. Toxicity evaluation of olive oil mill wastewater and its polar fraction using multiple whole-organism bioassays, **Science of The Total Environment**, v. 686, p. 903-914.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. Tradução de Marco Tadeu Grassi et al. 94. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.

COSTA, L. G. **Toxicologia: Princípios Básicos**. São Paulo: Elsevier, 2018.

DÖRR, F. A. et al. **Ecotoxicologia: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Editora Rima, 2014.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E. et al.. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. CETESB, São Paulo, Série manuais, v. 6, 17p., 1990.

PAIXÃO, S. M. et al. Acute toxicity evaluation of olive oil mil wastewaters: **Environmental Toxicology**. v. 14, n. 2, p. 263-269, 1999.

GREEN, J.W.; WHEELER, J. The use of carrier solvents in regulatory aquatic toxicology testing: practical, statistical and regulatory considerations. **Aquatic Toxicology**, 144-145, 242-249, 2013.

KNIE, E.; LOPES, S. **Fisiologia digestiva em animais**. São Paulo: Editora ABC, 2004.

MASELLI, B. S. et al. Testes ecotoxicológicos: Abordagens integrativas para avaliação de risco ambiental. **Química Nova**, v. 40, n. 3, p. 312-321, 2017.

MIURA, P. T. et al. Study of the chemical composition and ecotoxicological evaluation of essential oils in *Daphnia magna* with potential use in aquaculture. **Aquaculture research**, v. 52, n. 7, p. 3415-3424, 2021.

RATTE, H. T. et al. **Guidelines for algal and cyanobacterial biomonitors of freshwater and terrestrial environments**. Jena: VCH, 2003.

SISINNO, Cristina Lucia Silveira; OLIVEIRA-FILHO, Eduardo Cyrino. **Princípios de toxicologia ambiental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETT, M. M. Análises químicas de efluentes industriais complexos e estimativa de seus efeitos sobre organismos aquáticos. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1085-1092, 2006.

WONG, L. et al. Toxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) and its major limonoid constituent, andirobin, on aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 2, p. 447-453, 2009.

CAPÍTULO 3 - DEMOGRAFIA E CICLO DE VIDA DE *Daphnia magna*, SUBMETIDA À TOXICIDADE DO ÓLEO DE ANDIROBA UTILIZADO COMO REPELENTE NATURAL

DEMOGRAPHY AND LIFE CYCLE OF *Daphnia magna*, SUBJECTED TO THE TOXICITY OF ANDIROBA OIL USED AS A NATURAL REPELLENT

RESUMO

A *Daphnia magna* é um organismo modelo comum usado em testes toxicológicos, devido à sua ampla distribuição em ambientes aquáticos e ao seu ciclo de vida curto, além de ser fácil de criar em laboratório. Para o cultivo de cladóceros e para experimentos foi, usada água natural e algas da espécie *Chlorella sorokiniana*, como dieta. Para a cultura de Daphnias foi utilizado o meio EPA modificado. As condições experimentais gerais incluíram o uso de frascos transparentes de 50 mL, contendo uma proporção de 1:1 de água do meio e substância teste nos tratamentos, e controle com água do meio. Cada frasco de teste recebeu 10 neonatos (<24 h) do organismo teste, *Daphnia magna*. Foram realizados cálculos relacionados à análise demográfica, como duração média de vida, expectativa de vida, taxa bruta de reprodução, taxa líquida da de reprodução, tempo de geração e taxa intrínseca de crescimento populacional. Em geral, a toxicidade do óleo de andiroba provocou mortandade em *Daphnia magna* em comparação com o controle, independentemente de qualquer concentração testada. Os padrões de fertilidade de *D. magna* mostraram diminuição na produção de neonatos com o aumento da concentração do óleo de andiroba. Os resultados do experimento indicaram que o óleo de andiroba teve efeitos tóxicos em *Daphnia magna*, sendo importante para avaliar a segurança desse produto químico, contribuindo significativamente para a compreensão dos riscos associados ao seu uso.

Palavras-chave: Toxicidade. Ciclo de vida. *Daphnia magna*.

ABSTRACT

Daphnia magna is a common model organism used in toxicological testing because it is widely distributed in aquatic environments, has a short life cycle and is easy to rear in the laboratory. For the cultivation of cladocerans and for experiments, natural water and algae of the species *Chlorella sorokiniana* was used as diet. For *Daphnia* culture, modified EPA

medium was used. And the general experimental conditions were: 50 mL transparent bottles, in a 1:1 ratio, of medium water and test substance, in treatments and control with medium water, where each test bottle received 10 neonates (<24 h) from the test organism, *Daphnia magna*. Calculations related to demographic analysis were determined, such as average lifespan, life expectancy, gross reproduction rate, net reproduction rate, generation time and intrinsic population growth rate. In general, the toxicity of andiroba oil promoted mortality in *Daphnia magna* compared to the control, regardless of any concentration tested. The fertility patterns of *D. magna* showed a decrease in the production of neonates with increasing andiroba oil concentration. The results of the experiment indicated that andiroba oil had toxic effects on *Daphnia magna*, being important to evaluate the safety of this chemical product, contributing significantly to the understanding of the risks associated with its use.

Key words: Toxicity. Life cycle. *Daphnia magna*.

INTRODUÇÃO

A *Daphnia magna* é frequentemente usada como organismo modelo em testes toxicológicos (TKACZYK et al., 2021), como os experimentos de 21 dias, devido a várias vantagens apresenta, incluindo facilidade de criação em laboratório, o que torna uma opção atraente para experimentos em grande escala. Além disso, sua sensibilidade aos compostos tóxicos permite que reaja rapidamente a concentrações subletais dessas substâncias, tornando-a um organismo modelo útil para detectar e avaliar efeitos tóxicos em testes de curto prazo. Por ser de pequeno porte, a *Daphnia magna* é um organismo relativamente fácil de manipular experimentalmente, o que também ajuda a minimizar os custos de manutenção.

Os dafnínídeos são microcrustáceos zooplancctônicos abundantes em lagos e lagunas de água doce, pois são eficazes herbívoros no fitoplâncton, que é o principal produtor primário em águas continentais. Além disso, são uma escolha preferencial como alimento para vertebrados e invertebrados predadores (Cooney, 1995). A *Daphnia magna*, em particular, desempenha um papel fundamental na cadeia alimentar aquática e é frequentemente utilizada como alimento para peixes e outros organismos maiores.

Assim, a *Daphnia magna* é um organismo modelo comumente utilizado em testes toxicológicos, devido à sua ampla distribuição em ambientes aquáticos, ciclo de vida curto e facilidade de criação em laboratório. Este microcrustáceo é sensível a substâncias tóxicas e

é facilmente cultivado em laboratório, tornando-se um modelo útil nesta área (BOWNIK, 2017). Ela desempenha papel significativo nos estudos de toxicidade em água, uma vez que os organismos aquáticos habitam ambientes naturais semelhantes à água, destacando-se ainda o curto período de exposição e os pequenos volumes de amostras utilizados, aspectos essenciais na utilização deste microcrustáceo (ABNT, 2016).

Nesse contexto, os espécimes usados em bioensaio devem ser inseridos com menos de 24 horas para uso em bioensaios (KNIE; LOPES, 2004). De acordo com Zagato (1988), a diferença de sensibilidade está associada à idade e com ao tempo de exposição. Os dados sobre a história de vida coletados ao longo do ciclo de vida dos organismos no teste podem ser posteriormente processados para estimar as taxas específicas de sobrevivência e fecundidade específicas da idade ou do estágio.

Portanto, para realizar tal estudo é necessário abordar os seguintes objetivos deste trabalho: a) Avaliar a toxicidade crônica do óleo de andiroba em *Daphnia magna*, utilizando concentrações subletais do produto químico e avaliando o efeito na reprodução, crescimento e sobrevivência dos organismos ao longo do tempo. b) Identificar os efeitos do óleo de andiroba em diferentes estágios de desenvolvimento de *Daphnia magna*, para entender se há alguma idade do ciclo de vida do organismo aquático que seja mais sensível à substância.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a manutenção de *Daphnias*, cultura de algas as cepas das algas foram obtidas do laboratório de Análises de Água e Limnologia e foram cultivadas em lotes em frascos transparentes de 2 litros usando meio Bold' (BOROWITZKA; BOROWITZKA, 1988). A densidade das algas foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer. As culturas estoque em frascos experimentais foram mantidas a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7,0 a 7,5 e iluminação fluorescente contínua, mas difusa (NANDINI; SARMA, 2003).

Para o cultivo de cladóceros e para experimentos, foi utilizada água natural e apenas algas como dieta. Para a cultura de *Daphnias*, o meio EPA foi preparado dissolvendo 0,095g de NaHCO_3 , 0,06g de CaSO_4 , 0,06g de MgSO_4 e 0,002g de KCl em um litro de água natural.

Quanto ao produto utilizado no experimento, foi o óleo de andiroba. Todas as concentrações da substância testada foram adequadamente baseadas na concentração real do

ingrediente ativo. Como as espécies de cladóceras testadas diferiam em sua tolerância ao óleo, conduzimos separadamente uma série de testes preliminares de alcance.

Quanto à tabela de vida demográfica, as condições experimentais gerais foram as seguintes: frascos transparentes de 50 mL como recipientes de teste; cada concentração de óleo de andiroba foi dissolvida em 25 ml de água destilada mais 25 ml de meio EPA com 1×10^6 células/ml de cada frasco de teste recebeu 10 neonatos (<24 h) do organismo teste. Foram usadas três réplicas para cada concentração e as observações dos experimentos eram realizadas, em dias intercalados, onde os organismos eram contados e os neonatos nascidos eram descartados.

$$\text{Duração média de vida: } L_x = \frac{n_x1 + n_x2}{2}$$

$$\text{Expectativa de vida: } e_x = \frac{T_x}{n_x}$$

$$\text{Taxa bruta de reprodução: } R = \sum_0^{\infty} m_x$$

$$\text{Taxa de reprodução líquida: } R_0 = \sum_0^{\infty} l_x \cdot m_x$$

$$\text{Tempo de geração: } T = \frac{\sum_0^{\infty} l_x \cdot m_x \cdot x}{R_0}$$

$$\text{Taxa de crescimento populacional a cada dia: } \sum_{x=w}^n e^{-rx} \cdot l_x \cdot m_x = 1$$

Onde l = Proporção de sobreviventes no início da idade x (dias), m = Progenie produzida pela fêmea na idade x , T = Número cumulativo de indivíduos desde a idade até a idade máxima, n = número de indivíduos vivos no início da idade x .

Na análise estatística realizada, dependendo da normalidade e/ou heterogeneidade de variância, foi utilizado transformação de dados em $\log(x)+1$. Em seguida, de acordo com esses pressupostos, foi realizada a análise de variância ANOVA ou o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Tukey ou Dunn, para avaliar a significância estatística das diferenças entre as respostas dos tratamentos. O nível de significância estatística foi estabelecido em p igual ou menor que 0,05. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software Past.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

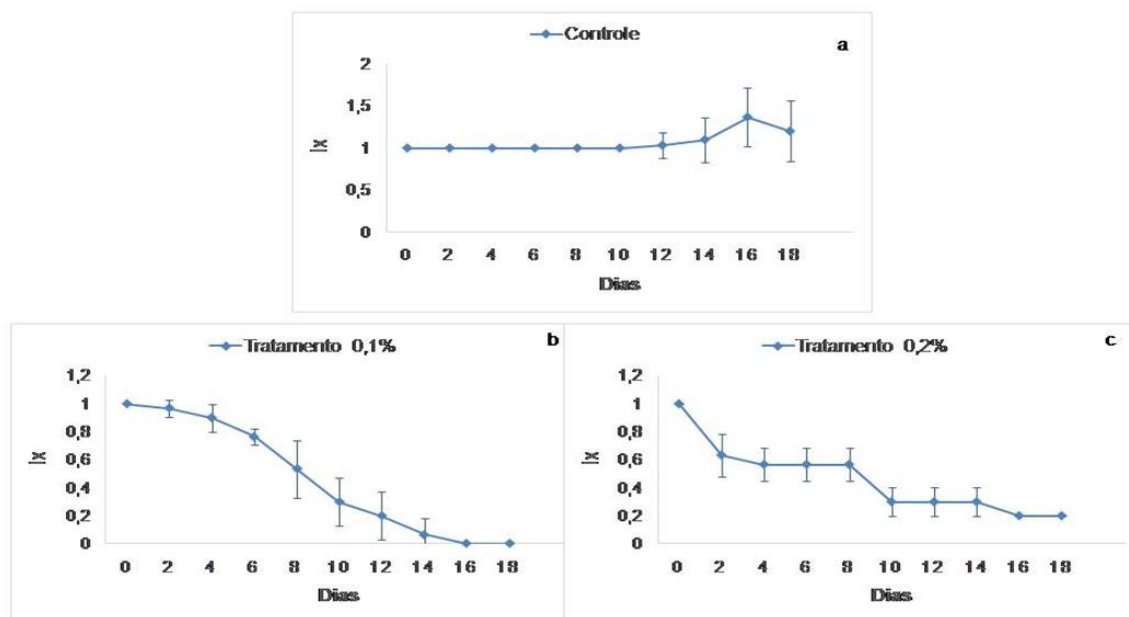
As figuras 2.1(a, b, c, d e f) apresentam as curvas de sobrevivência do controle e dos tratamentos com exposição ao óleo de andiroba. Em geral, a toxicidade do óleo de andiroba resultou em mortalidade em *Daphnia magna* em comparação com o controle ($p < 0,05$), independentemente da concentração testada. As maiores mortalidades ocorreram nos dias 8 e 10 na maioria dos tratamentos. As curvas de expectativa de vida por idade de *Daphnia magna* nas diferentes concentrações testadas mostraram uma diminuição na sobrevivência com o aumento da idade da coorte. De forma geral, para *D. magna*, qualquer incremento no óleo de andiroba resultou em diminuição da sobrevivência.

Müller et al. (2019), observando a toxicidade crônica em concentrações cerca de dez vezes maiores, em fração solúvel de diesel, também um óleo de origem vegetal, relataram que afetou a longevidade. Assim, o óleo de andiroba afetou as curvas de sobrevivência ao longo do ciclo de vida de *Daphnia*, mesmo quando usado em proporções mínimas.

As figuras 2.2 (a, b, c, d, e e f) apresentam a fertilidade diária do controle e cinco tratamentos. Assim, a *Daphnia magna* produziu neonatos durante a maior parte do seu ciclo de vida; no entanto, o número de neonatos por episódio reprodutivo foi baixo. Os padrões de fertilidade de *D. magna* mostraram diminuição na produção de neonatos com o aumento da concentração do óleo de andiroba. Isso foi similar ao observado por Maranhão et al. (2014), quando relataram em um teste de toxicidade crônica com óleo de Neem em *Daphnia magna*, onde concentrações semelhantes às usadas neste estudo afetaram a reprodução. Diante disso, concluímos que o óleo influenciou negativamente na descendência de *Daphnia magna*.

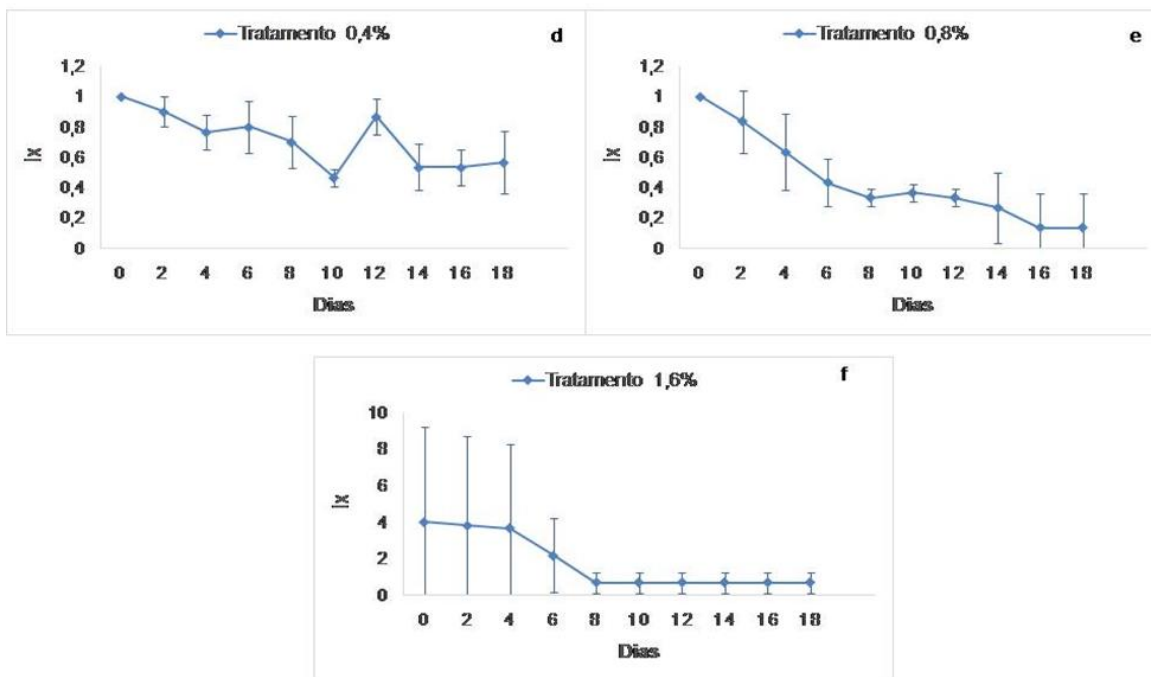
Em geral, a produção de descendentes não seguiu um padrão ao longo dos dias em todos os tratamentos, mas foi menor nas maiores concentrações, entre 0,4 e 1,6%. Os neonatos foram mais sensíveis do que os adultos à exposição ao óleo de andiroba. Os efeitos tóxicos incluem impactos na sobrevivência, reprodução e desenvolvimento da espécie.

FIGURA 2.1 Sobrevivência (lx) de *Daphnia magna* cultivada em meio EPA (a) e óleo de andiroba à 0,1 e 0,2 (b e c).



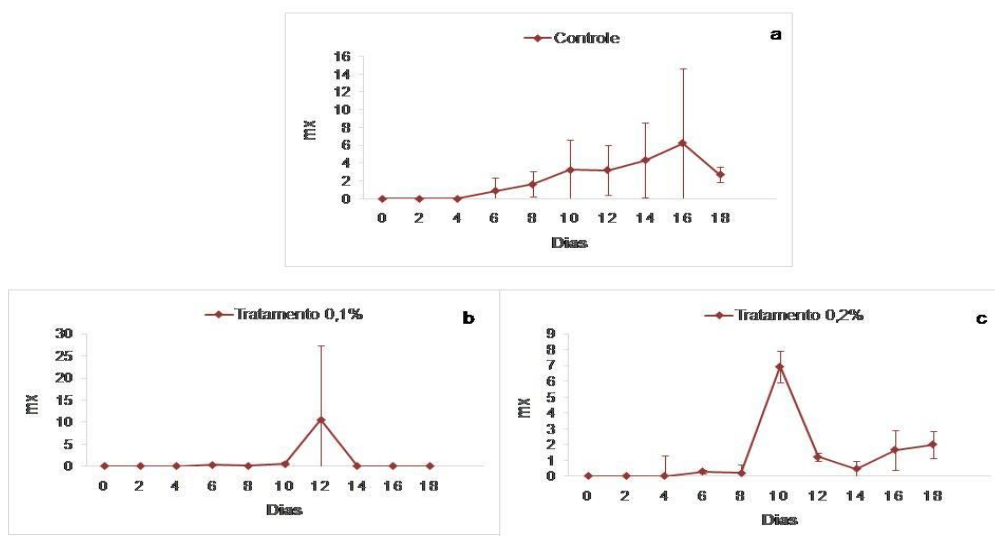
Fonte: Autores (2024)

FIGURA 2.1 (cont.). Sobrevivência (lx) de *Daphnia magna* cultivada em óleo de andiroba à 0,4, 0,8 e 1,6% (d, e, f).



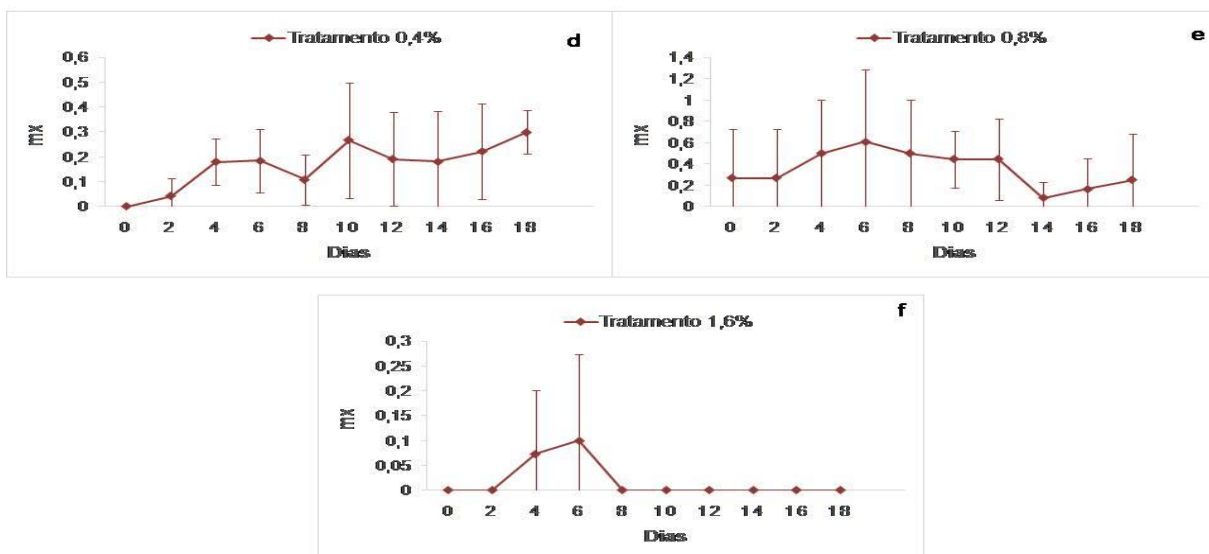
Fonte: Autores (2024)

FIGURA 2.2 Fertilidade (mx) de *Daphnia magna* cultivada em meio EPA (a) e óleo de andiroba à 0,1 e 0,2 (b e c).



Fonte: Autores (2024)

FIGURA 2.2 (cont.). Fertilidade (mx) de *Daphnia magna* cultivada em óleo de andiroba à 0,4, 0,8 e 1,6% (d, e, f).



Fonte: Autores (2024)

A TABELA 3.1 apresenta um sumário dos resultados obtidos para Análise de Variância ou Teste de Kruskal-Wallis de *D. magna* quando os neonatos foram submetidos ao controle e aos diferentes tratamentos propostos. Todos os tratamentos apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os resultados obtidos no Teste de Tukey ou de Dunn são apresentados na tabela 2, que mostra o valor de p representando a significância entre os tratamentos. Foram observadas diferenças entre o controle e os tratamentos. Em estudos realizados por Viana et al. (2023) em *Daphnia magna*, utilizando água contaminada com resíduos de petróleo, considerada altamente impactante, observou-se uma redução na reprodução e uma queda na taxa intrínseca de crescimento populacional.

TABELA 3.1 – Resultados da ANOVA ou Kruskal Wallis.

*Indica diferença significativa entre os tratamentos

Fator	Graus de Liberdade	F ou H	Valor P
Duração média de vida	5	9,6260	0,08
Expectativa de vida	5	11,4500	0,04*

Taxa bruta de reprodução	5	6,2010	0,004*
Taxa de reprodução líquida	5	8,5619	0,001*
Tempo de geração	5	5,3750	0,008*
Taxa intrínseca de crescimento populacional	5	2,9610	0,05*

Fonte: Os autores

TABELA 3.2 – Resultados do teste de Tukey ou Dunn.

*Indica diferença significativa entre os tratamentos

Expectativa de vida						
Tratamentos	Controle	0,1%	0,2%	0,4%	0,8%	1,6%
Controle		0,1164	0,07814	0,00099*	0,08484	0,2836
0,1%	0,11640		0,8482	0,08484	0,8783	0,6186
0,2%	0,07814	0,8482		0,1256	0,9695	0,4906
0,4%	0,00099*	0,08484	0,1256		0,1164	0,02634*
0,8%	0,08484	0,8783	0,9695	0,1164		0,515
1,6%	0,28360	0,6186	0,4906	0,02634*	0,5150	
Taxa bruta de reprodução						
Tratamentos	Controle	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
Controle		0,6769	0,9996	0,156	0,4626	0,004257*
0,1	2,106		0,8326	0,8429	0,9987	0,05148
0,2	0,4207	1,685		0,2434	0,6297	0,006943*
0,4	3,76	1,653	3,339		0,9642	0,3164
0,8	2,644	0,5374	2,223	1,116		0,0964
1,6	6,832	4,726	6,411	3,072	4,188	
Taxa de reprodução líquida						
Tratamentos	Controle	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
Controle		0,03322*	0,2291	0,01357*	0,0279*	0,000446*
0,1	5,094		0,8292	0,9937	1	0,1497
0,2	3,398	1,696		0,5394	0,7785	0,02061*
0,4	5,844	0,7498	2,446		0,9977	0,3239
0,8	5,24	0,1461	1,842	0,6037		0,1755
1,6	8,891	3,797	5,493	3,047	3,651	
Tempo de geração						
Tratamentos	Controle	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
Controle		0,3823	0,9304	0,6491	0,1484	0,004793*
0,1	2,867		0,8743	0,9957	0,9829	0,1393
0,2	1,318	1,549		0,9885	0,5233	0,02275*
0,4	2,175	0,6919	0,8567		0,8503	0,06301
0,8	3,805	0,9379	2,486	1,63		0,363
1,6	6,729	3,862	5,411	4,554	2,924	
Taxa intrínseca de crescimento populacional por dia						

Tratamentos	Controle	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
Controle		0,5104	0,9184	0,4042	0,9272	0,0354*
0,1	2,519		0,9602	0,9999	0,9541	0,5095
0,2	1,374	1,145		0,9057	1	0,1726
0,4	2,803	0,2842	1,429		0,8955	0,6238
0,8	1,334	1,186	0,04081	1,47		0,1651
1,6	5,041	2,521	3,666	2,237	3,707	

Fonte: Os autores

Os resultados do experimento indicaram que o óleo de andiroba teve efeitos tóxicos em *Daphnia magna*, sendo importante para avaliar a segurança desse produto químico, contribuindo significativamente para a compreensão dos riscos associados ao seu uso. O estudo destacou a importância de considerar tanto as concentrações quanto o tempo de exposição ao avaliar os efeitos ecotoxicológicos. Isso é crucial para liberar o uso contínuo do óleo de andiroba, tendo em vista sua toxicidade para Dafinideos.

CONCLUSÃO

Resultados de estudos dessa natureza são significativos porque permitem a compreensão de como essas substâncias podem afetar os organismos aquáticos, além de sua relevância para a saúde humana e o meio ambiente. Também são importantes para entender os potenciais impactos do óleo de andiroba como repelente.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Acre, representada pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação pelo financiamento do Cartão Pesquisador que deu suporte à pesquisa, e pela bolsa de Pós-Graduação concedida pela CAPES.

BIBLIOGRAFIA

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda: Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera)**. 4. ed. Rio de Janeiro, 2016.

BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). **Micro-algal Biotechnology**. Cambridge University Press, Cambridge. 1988.

BOWNIK, A. **Daphnia swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review.** Science of the Total Environment., v. 601-602, p.194-205, 2017.

COONEY, J. D. **Freshwater test.** In: RAND, G. M. (ed.). Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate, and risk assessment Taylor & Francis, Washington, 1995, pp. 71-102.

KNIE, J.L.W.; LOPES, E.W.E. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis, FATMA/GTZ, 2004.

MARANHO, L. A. et al. **Testing the Neem Biopesticide (*Azadirachta indica* A. Juss) for acute toxicity with *Danio rerio* and for chronic toxicity with *Daphnia magna*.** Journal of agricultural science and technology, v.16, n. 1, p.105-111, 2014.

MÜLLER, J.B. et al. Comparative assessment of acute and chronic ecotoxicity of water soluble fractions of diesel and biodiesel on *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*, Chemosphere, v. 221, p. 640-646, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.069>.

TKACZYK, A. et al. ***Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review,** Science of The Total Environment, v. 763, 143038, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143038>.

VIANA, T. et al. Magnetized vermiculite as a tool for the treatment of produced water generated by oil companies: Effects on aquatic organisms before and after treatment. **Journal applied of toxicology**, v. 43, n.9, p. 1393-1405, 2023.

<https://doi.org/10.1002/jat.4473>.

ZAGATO, P. A. **Sensibilidade de *Daphnia similis*: controle de qualidade de culturas,** Ambiente, v. 2, n. 2, 79-83, 198.

ANEXO

Demografia e ciclo de vida de Daphnia Magna, submetida à toxicidade do óleo de andiroba utilizado como repelente natural

Demography and life cycle of Daphnia Magna, subjected to the toxicity of andiroba oil used as a natural repelente

Daphnia Magna, sometida a la toxicidad del aceite de andiroba utilizado como repelente natural, demografia y ciclo de vida

DOI: 10.55905/oelv22n2-112

Originals received: 01/02. 2024

Acceptance for publication: 01 26/2024

Silvana Daniel da Silva

Pós-Graduanda em Ciências Ambientais

Instituição: Instituto da Biodiversidade da Universidade Federal do Acre Endereço: Campus de Cruzeiro do Sul, Glebas Formoso, Canela Fina, Acre E-mail: silvana.danielsou.ufac.br

Karissa Conceição Souza

Licencianda em Ciências Biológicas

Instituição: Instituto da Biodiversidade da Universidade Federal do Acre Endereço: Campus de Cruzeiro do Sul, Glebas Formoso, Canela Fina, Acre E-mail: karissa.souza@sou.ufac.br

diária de Fútima ã4arinho Pereira
Graduanda em Engenharia Agrônômica

Instituição: Instituto da Biodiversidade da Universidade Federal do Acre Endereço: Campus de Cruzeiro do Sul, Glebas Formoso, Canela Fina, Acre E-mail: maria.marinho@sou.iifac.br

Erlei Cassiano Keppeler

Doutora em Aquicultura

Instituição: Instituto da Biodiversidade da Universidade Federal do Acre Endereço: Campus de Cruzeiro do Sul, Glebas Formoso, Canela Fina, Acre E-mail: erlei.keppeler@ufac.br

RESUMO

A *Daphnia* longis is a common model organism used in toxicological tests, as it is widely distributed in aquatic environments, has a short life cycle and is easy to raise in the laboratory. For the cultivation of cladocerans and for experiments, natural water was used.

e algas da espécie *Cladophora*, como dieta. Para a cultura de *Daphnia* foi utilizado o meio EPA modificado. E as condições experimentais gerais foram: frascos

transparentes de 50 mL, na proporção 1:1, de água do meio e substância teste, nos tratamentos e controle com água do meio, onde cada frasco de teste recebeu 10 neonatos (<24 li) do organismo teste. *Daphnia magna*. Foram determinados cálculos relacionados à análise demográfica, como duração média de vida, expectativa de vida, taxa bruta de reprodução, taxa líquida de reprodução, tempo de geração e taxa intrínseca de crescimento populacional. Em geral, a toxicidade do óleo de andiroba promoveu em *Daphnia magna* drinque, mortalidades em relação ao controle, independente de qualquer concentração testada. Os padrões de fertilidade de *D. magna* mostraram diminuição na produção de neonatos com o aumento da concentração do óleo de andiroba. Os resultados do experimento indicaram que o óleo de andiroba teve efeitos tóxicos em *Daphnia magna*, sendo importante para avaliar a segurança desse produto químico, contribuindo significativamente para a compreensão dos riscos associados ao seu uso.

Palavras-chave: toxicidade, ciclo de vida, *Daphnia magna*.

ABSTRACT

Daphnia magna is a common model organism used in toxicological testing because it is widely distributed in aquatic environments, has a short life cycle and is easy to rear in the laboratory. For the cultivation of cladocerans and for experiments, natural water and algae of the species *Cladophora* were used as diet. For *Daphnia* culture, modified EPA medium was used. And the general experimental conditions were: 50 mL transparent bottles, in a 1:1 ratio, of medium water and test substance, in treatments and control with medium water, where each test bottle received 10 neonates (<24 li) from the test organism, *Daphnia magna*. Calculations related to demographic analysis were determined, such as average lifespan, life expectancy, gross reproduction rate, net reproduction rate, generation time and intrinsic population growth rate. In general, the toxicity of andiroba oil promoted mortality in *Daphnia magna* compared to the control, regardless of any concentration

tested. The fertility patterns of *D. magiiri* showed a decrease in the production of neonates with increasing andiroba oil concentration. The results of the experiment indicated that andiroba oil had toxic effects on *Driplmiri mngiin*, being important to evaluate the safety of this chemical product, contributing significantly to the iinderstanding of the risks associated with its use.

Keywords: toxicity, life cycle. *Dnpltiiri Mrigiiio*.

RESUMEN

Driplmiri mngiiri es un organismo modelo común utilizado en ensayos toxicológicos, ya que se distribuye ampliamente en ambientes acuáticos, tiene un ciclo de vida corto y es fácil de crear en el laboratorio. El agua natural y las algas de la especie *Cltlorellci 3Ol'Ol"iiiiatia* se utilizaron como dieta para el cultivo de cladocidades y para experimentos. Para el cultivo de *Daphnia* se utilizó el medio EPA modificado. Y las condiciones generales experimentales fueron: frascos transparentes de 50 mL, en la proporción 1:1, de agita del medio y sustancia problema, en los tratamientos y control con agua del medio, donde cada frasco de prueba recibió 10 neonatos (<24 li) del organismo de pnieba, *Daphnia inagna*. Se detenninaron los cálculos relacionados con el análisis demográfico, como la esperanza de vida media, la esperanza de vida, la tasa bnita de reproducción, la tasa neta de reproducción, el tiempo de generación y la tasa intrínseca de crecimiento poblacional. En general, la toxicidad del aceite de andiroba promovió en *Dnpliioo iin7giio*, mortalidad en relación con el testigo, independientemente de cualquier concentración ensayada. Los patrones de fertilidad de *D. niagun* mostraron una disminución en la producción neonatal con mayor concentración de aceite de andiroba. Los resultados del experimento indicaron que el aceite de andiroba tuvo efectos tóxicos sobre *Dopliiia mogim*, siendo importante evaluar la seguridad de esta sustancia química. contribuyendo significativamente a la comprensión de los riesgos asociados a su uso.

Palabras clave: toxicidad, ciclo de vida, *Dnplitiia Magna*.

1 INTRODUÇÃO

A *Dafilmia iirigiiio* é frequentemente usada como organismo modelo em testes toxicológicos (TKACZYK et, 2021), como os experimentos de 21 dias, porque apresenta muitas

vantagens, que inclui facilidade de criação em laboratório, tornando-a uma opção atraente para experimentos em grande escala. Além do mais, a sensibilidade aos compostos tóxicos e reage rapidamente a concentrações subletais dessas substâncias, o que a torna um organismo modelo útil para detectar e avaliar efeitos tóxicos em testes de curto prazo. De pequeno tamanho, a *Daphnia magna* é um organismo relativamente pequeno, o que facilita a manipulação experimental e minimiza os custos de manutenção.

Dafnideos são microcrustáceos zooplancônicos de água doce abundantes em lagos e lagoas, porque são animais herbívoros eficazes no fitoplâncton (maior produtor primário em águas continentais) e ainda são também, alimentos favoritos para vertebrados e invertebrados predadores (COONEY, 1995). Além disso, a *Daphnia magna* é um organismo chave na cadeia alimentar aquática e é usada como alimento para peixes e outros organismos maiores.

A *Daphnia magna* é um organismo modelo comum usado em testes toxicológicos, pois é amplamente distribuído em ambientes aquáticos, tem ciclo de vida curto e é fácil de criar em laboratório. O microcrustáceo *Daphnia magna* é sensível às substâncias tóxicas e são de fácil cultivo em laboratório, e desta forma são modelos úteis nessa área (BOWNIK, 2017). Ela merece destaque nos estudos acerca da toxicidade em água visto que são organismos aquáticos cujo habitat natural é semelhante às condições naturais encontradas na água, além do que, o breve tempo de exposição e os pequenos volumes de amostras utilizadas são aspectos importantes na utilização deste microcrustáceo (ABNT, 2016).

Os espécimes usados em bioensaio devem ser inseridos com menos de 24 li para risco em bioensaios (KNIE; LOPES, 2004). Segundo Zagato (1988), a diferença de sensibilidade está relacionada com a idade e com o tempo de exposição. Os dados da história de vida coletados ao longo do ciclo de vida dos organismos no teste podem ser posteriormente processados para estimar as taxas de sobrevivência e fecundidade específicas da idade e do estágio.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho são: a) Avaliar a toxicidade crônica do óleo de andiroba em *Daphnia magna*, utilizando concentrações subletais do produto químico e avaliando o efeito na reprodução, crescimento e sobrevivência dos organismos ao longo do tempo. b) Identificar os efeitos do óleo de andiroba em diferentes estágios de desenvolvimento

de *Daphnia uiaqua*, para entender se há alguma idade do ciclo de vida do organismo aquático que seja mais sensível à substância.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a manutenção de Daphnias, cultura de algas as cepas das algas foram obtidas do laboratório de análises de água e Limnologia, e foram cultivadas em lotes em frascos transparentes de 2.1 usando meio Bold' (BOROWITZKA; BOROWITZKA, 1988). A densidade de algas foi enumerada usando câmara de Neubauer. Culturas estoque de frascos de teste bem-experimentais foram mantidas a 23±1°C, pH 7,0 a 7,5 e iluminação fluorescente contínua, inas difusa (NANDINI; SARMA, 2003).

Para o cultivo de cladóceros e para experimentos usamos água natural e apenas algas como dieta. Para a cultura de Daphnias foi utilizado o meio EPA foi preparado dissolvendo 0.095g de NaHCO₃, 0,06g de CaSO₄, 0,06g de MgSO₄ e 0,002g de KCl em um litro de água natural.

Quanto ao produto utilizado no experimento foi o óleo de andiroba. Todas as concentrações da substância testem foram adequadamente baseadas na concentração real do ingrediente ativo. Como as espécies de cladóceras testadas diferiam em sua tolerância ao óleo, conduzimos separadamente uma série de testes preliminares de alcance.

Quanto à tabela de vida demográfica, as condições experimentais gerais foram as seguintes: frascos transparentes de 50 mL como recipientes de teste; Cada concentração de óleo de andiroba foi dissolvida em 25 mL de água destilada mais 25 mL de meio EPA com 1x10⁶ células/mL de cada frasco de teste recebeu 10 neonatos (<24 li) do organismo teste. Foram realizadas três réplicas para cada concentração e as observações dos experimentos eram realizadas, em dias intercalados, onde os organismos eram contados e os neonatos nascidos eram descartados.

$$\text{Duração média de vida: } L_x = \frac{n_x1 + n_x2}{2}$$

$$\text{Expectativa de vida: } e_x = \frac{T_x}{n_x}$$

Taxa bruta de reprodução: $R = \sum_0^{\infty} m_x$

Taxa de reprodução líquida: $R_0 = \sum_0^{\infty} l_x \cdot m_x$

Tempo de geração: $T = \frac{\sum_0^{\infty} l_x \cdot m_x \cdot x}{R_0}$

Taxa de crescimento populacional a cada dia: $\sum_{x=w}^n e^{-rx} \cdot l_x m_x = 1$

l = Proporção de sobreviventes no início da idade x (dias), m = Progenie produzida pela fêmea na idade x ,

T = Número médio de indivíduos desde a idade até a idade máxima. n = número de indivíduos vivos no início da idade x .

Na análise estatística realizada, dependendo da normalidade e/ou heterogeneidade de variância foi utilizado transformação de dados em $\log(x)+1$. Em seguida, dependendo destes pressupostos gerais, realizou-se análise de variância ANOVA ou Kruskal Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Tukey ou Dunn, para avaliar a significância estatística das diferenças entre as respostas dos tratamentos. A significância estatística foi estabelecida

no nível de p igual ou menor que 0,05. As análises estatísticas foram realizadas com o software Past.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

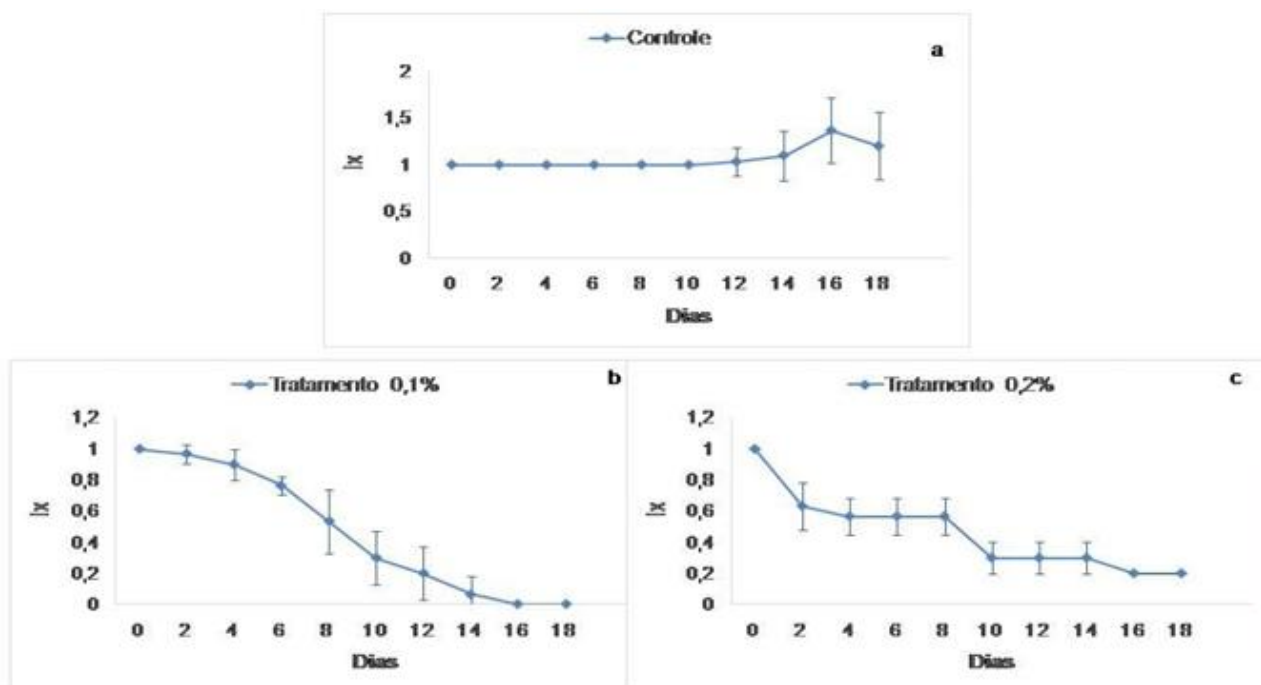
As figuras 1a, 1b, 1c, 1d e 1f, apresentam as curvas de sobrevivência do controle e em tratamentos com a exposição do óleo de andiroba. Em geral, a toxicidade do óleo de andiroba promoveu em *Daphnia pulex* mortalidades em relação ao controle ($p < 0,05$), independentemente de qualquer concentração testada. Maiores mortalidades ocorreram nos dias 8 e 10, na maioria dos tratamentos. As curvas de expectativa de vida por idade de *Daphnia pulex*, nas diferentes concentrações testadas, mostraram diminuição na sobrevivência com o aumento da idade da coorte. Em geral, para *D. pulex* qualquer incremento em óleo de andiroba resultou em diminuição na sobrevivência. Müller et al. (2019), observando a toxicidade crônica em concentrações cerca de dez vezes maiores, em fração solúvel de diesel também um óleo de origem vegetal, relatavam que afetou a longevidade. Assim, óleo

de andiroba afetou as curvas de sobrevivência, ao longo do ciclo de vida de *Daphnia*, mesmo quando usado em proporções mínimas.

As figuras 2a, 2b, 2c, 2d, 2e e 2f apresentam a fertilidade diária do controle e cinco tratamentos. *Daphnia magna* produziu neonatos durante a maior parte do seu ciclo de vida, todavia o número de neonatos por episódio reprodutivo foi baixo. Os padrões de fertilidade de *D. magna* mostraram diminuição na produção de neonatos com o aumento da concentração do óleo de andiroba. Isso ocorreu semelhante em Maranhão et al. (2014), quando relataram no teste de toxicidade crônico com óleo de Nigella em *Daphnia magna*, onde também concentrações similares, as usadas neste estudo afetaram a reprodução, naquele estudo. Diante disso, concluímos que o óleo influenciou negativamente na descendência de *Daphnia*.

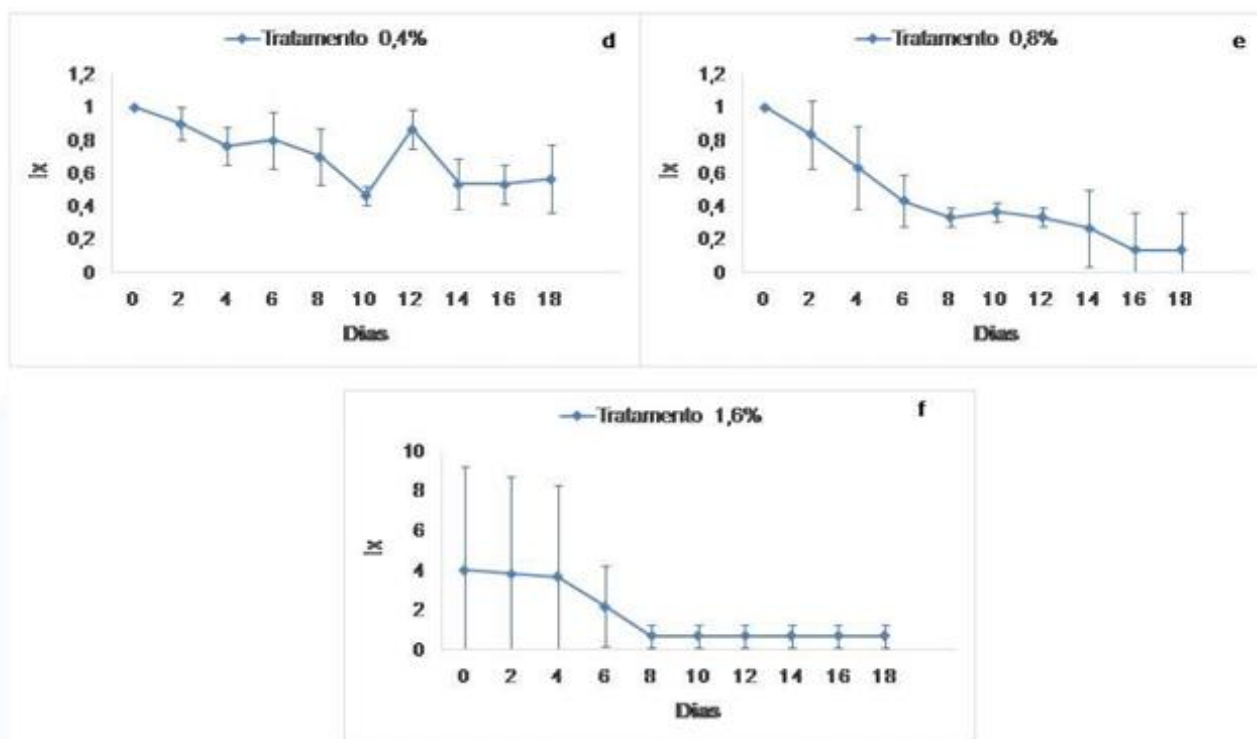
Em geral, a produção de descendentes não seguiu um padrão ao longo dos dias, em todos os tratamentos, mas foi menor nas maiores concentrações, entre 0,4 e 1,6%. Os neonatos foram mais sensíveis do que os adultos à exposição ao óleo de andiroba. Os efeitos tóxicos incluem impactos na sobrevivência, reprodução e desenvolvimento da espécie.

Figura 1. Sobrevivência (lx) de *Daphnia magna* cultivada em meio EPA (a) e óleo de andiroba à 0,1 e 0,2 (b e c).



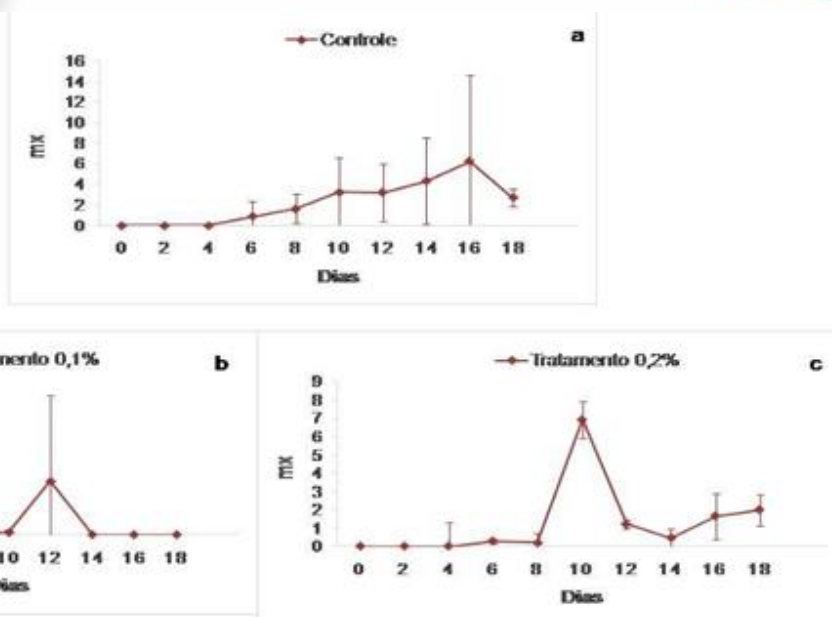
Fonte: Autores (2024)

Figura 2 (cont.). Sobrevivência (lx) de *Daphnia magna* cultivada em óleo de andiroba à 0,4, 0,8 e 1,6% (d, e, f).



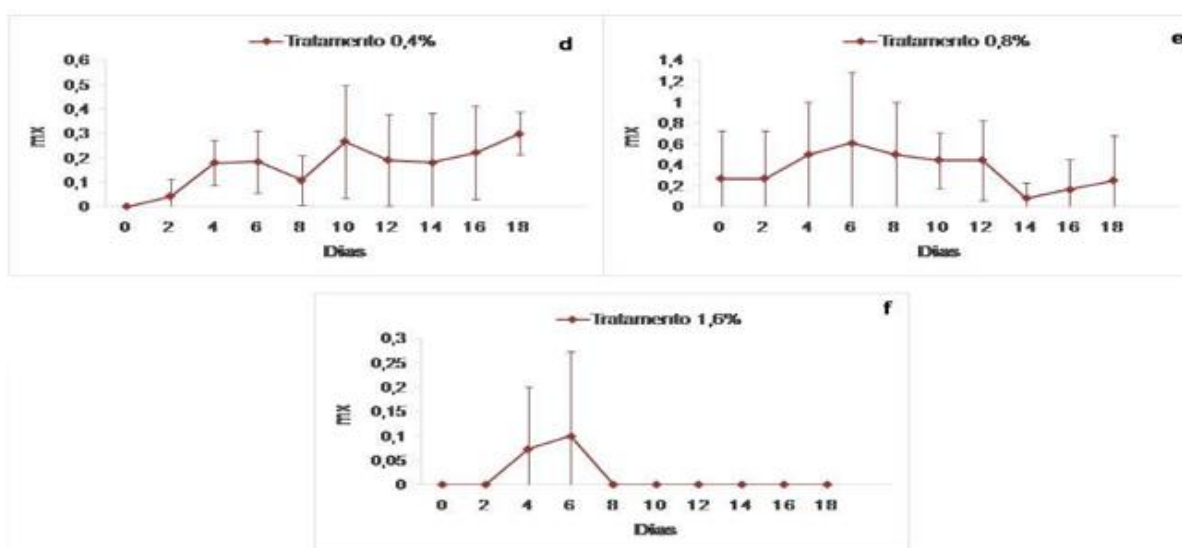
Fonte: Autores (2024)

Figura 3. Fertilidade (lx) de *Daphnia magna* cultivada em meio EPA (a) e óleo de andiroba à 0,1 e 0,2 (b e c).



Fonte: Autores (2024)

Figura 4. (cont.). Sobre o crescimento (Lx) de *Daphnia magna* cultivada em óleo de andiroba à 0.4, 0.8 e 1.6% (d, e, f).



Fonte: Autores (2024)



A Tabela 1 apresenta um sumário dos resultados obtidos para Análise de variância ou Teste de Kruskall Wallis de *D. mrigiiri* quando os neonatos foram submetidos ao controle e diferentes tratamentos propostos. Todos os tratamentos apresentaram diferença estatística significativa ($p = < 0,05$). Os resultados obtidos no Teste de Tukey ou de Dunn são apresentados na tabela 2, que mostra o valor de p , que representa a significância entre os tratamentos. Diferenças ocorreram entre o controle e os tratamentos. Em estudos realizados em *Dnpltiin itiogiiri* por Viana et al. (2023), utilizando água gerada com resíduos de petróleo, considerado altamente impactante, observaram reprodução reduzida e queda na taxa intrínseca de crescimento populacional.

Tabela 1 — Resultados da ANOVA ou Kruskall Wallis.

*Indica diferença significativa entre os tratamentos

Fator	Graus de Liberdade	F ou H	Valor P
Duração média de vida	5	9,6260	0,08
Expectativa de vida	5	11.4500	0,04*
Taxa bruta de reprodução	5	6,2010	0,004*
Taxa de reprodução líquida	5	8,5619	0,001*
Tempo de geração	5	,3730	0.008*
Taxa intrínseca	5	2,9610	0.05*



le crescimento
populacional

Fonte: Os autores

Tabela 2 — Resultados do teste de Tukey ou Duiui.

Expectativa de vida						
Tratarrientos	Controle	0.1%á	0,2%â	0.4°. â	0,8%ã	1.6° o
Controle		0.11 FI	0.07814	0.00099 *	0,08484	0.2836
0,1° â	0,11640		0,8482	0.08484	0,8783	0,6186
0,2° â	0,07814	0.8482		0,1236	0,9695	0,4906
0,4°. â	0.00099 *	0,08484	0,1236		0,1164	0,02634*
0,8°. â	0,08484	0.8783	0,9695	0,1164		0,5 II
1,6°. â	0,28360	0.6186	0,4906	0,02634 *	0,5150	
Tax	a bnita de re	produçã o				
Tratamentos	Controle	0,1	0.2	0,4	0.8	1,6
Controle		0.6769	0,9996	0.156	0,4626	0.00fi2â7 *
0.1	2.106		0,8326	0.8429	0,9987	0,05148
0.2	0.4207	1.685		0.2434	0.6297	0,006943 *
0.4	3,76	1.653	3.339		0.9642	0.31H
0.8	2.644	0.5374	2.223	1.116		0.09H
1.6	6.832	4.726	6.411	3.072	4.188	



Taxa	de	ção				
	reproduç	liquida				
Tratamentos	Controle	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
Controle		0.03322	0,2291	0,01357	0,0279*	0,0004fi6
		*		*		*
0,1	5.094		0,8292	0.9937	1	0.1497
0,2	3.398	1.696		0.Ü394	0.7785	0,02061*
0,4	5.844	0.7498	2.446		0.9977	0,3239
0,8	5,2fi	0.1461	1.842	0.6037		0,1755
1,6	8.891	3.797	5.493	3.047	3.651	
	Tempo	ração				
	de pe					
Tratamentos	Controle	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
Controle		0.3823	0,9304	0.6491	0.1484	0,004793
						*
0,1	2,867		0,8743	0.9957	0.9829	0,1393
0,2	1,318	1,549		0.9885	0.5233	0,02275*
0,4	2,175	0.6919	0,8567		0.8503	0.06301

0,8	3,805	0.9379	2.486	1,63		0,363
1,6	6,729	3,862	5.411	4.554	2.924	
Taxa	de	nto	nal por			
intrínseca	crecime	populaci				
	dia	o				
Tratamentos	Controle	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
Controle		0.5 104	0,9.184	0.4042	0.9272	0.0354*



0,1	2,5.19		0,9602	0.9999	0.9541	0,5095
0,2	1,374	1, 145		0.9057	1	0,1 726
0,4	2,803	0.2842	1.429		0.8955	0,6238
0,8	1,334	1, 186	0,0408.	1,47		0,165 1
1,6	5,04.1	2,521	3.666	2.237	3.707	

*Indica diferença significatix'a entre os tratamentos

Fonte: Os autores

Os resultados do experimento indicaram que o óleo de andiroba teve efeitos tóxicos em *Dnpluün mngtia*, sendo importante para avaliar a segurança desse produto químico, contribuindo signihcativamente para a compreensão dos riscos associados ao seu uso. O estudo destacou a importância de considerar tanto as concentrações. quanto o tempo de exposição ao avaliar os efeitos ecotoxicológicos. Isso é crucial para liberar o uso contínuo do óleo de andiroba, tendo em visto sua toxicidade para Dafinideos.

3 CONCLUSÃO

Resultados de estudos dessa natureza são significativos porque permitem a compreensão de como essas substâncias podem afetar os organismos aquáticos, bem corno sua relevância para a saíide humana e o meio ambiente. Também são importantes para entender os poteliciais impactos do óleo de andiroba corno repelente.

AGRADECIMENTOS

Á Universidade Federal do Acre, representada pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação pelo financiamento do Cartão Pesquisador que deu suporte à pesquisa e pela bolsa de Pós-Graduação, concedida pela CAPES.

REFERÊNCIAS

ABNT — ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713:

Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda: **Método** de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). 4. ed. Rio de Janeiro, 2016.

BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge. 1988.

BOWNIK, A. *Daphnia* swimming behavior as a bioindicator in toxicity assessment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 601-602, p.194-205, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.199>.

COONEY, J. D. Freshwater test. In: RAND, G. M. (ed.). *Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate, and risk assessment* Taylor & Francis, Washington. 1995, pp. 71-102.

KNIE, J.L.W.; LOPES, E.W.E. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis. FATMA/GTZ, 2004.

MARANHO, L. A. et al. Testing the Neem Biopesticide (*Azadirachtin* A. Juss) for acute toxicity with *Drosophila* and for chronic toxicity with *Daphnia*. **Journal of agricultural science and technology**, v.16, n. 1, p.105-111, 2014.

MULLER, J.B. et al. Comparative assessment of acute and chronic ecotoxicity of water soluble fractions of diesel and biodiesel on *Daphnia magna* and *Albino zebrafish*, **Chemosphere**, v. 221, p. 640-646, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.069>.

TKACZYK, A. et al. *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review, **Science of The Total Environment**, v. 763, 143038, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143038>.



VIANA, T. et al. Magnetized vermiculite as a tool for the treatment of produced water generated by oil companies: Effects on aquatic organisms before and after treatment. *Journal applied of toxicology*, v. 43, n.9, p. 1393-1405, 2023.

<https://doi.org/10.1002/jat.4473>.

ZAGATO, P. A. Sensibilidade de *Daphnia similis*: controle de qualidade de cultui'as, **Ambiente**, v. 2, n. 2, 79-83, 1988.